



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Entwicklung und Charakterisierung von
Protein-Nanokapseln als neues Drug Delivery System zur
intravesikalen Therapie von Harnwegsinfektionen“

verfasst von / submitted by

Julia Katharina Palmetzhofer, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra pharmaciae (Mag.pharm.)

Wien, 2021 / Vienna 2021

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael WIRTH

Danksagungen

Mein Dank gilt ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth und ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe am Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie. Danke für die hervorragende Betreuung und die Möglichkeit, einen Einblick in die Forschung zu bekommen.

Besonders möchte ich mich bei Mag. pharm. Katharina Skoll bedanken, die mir während meiner gesamten Masterarbeit mit viel Geduld und zahlreichen Hilfestellungen zur Seite gestanden ist.

Außerdem möchte ich mich bei allen anderen Kollegen der Arbeitsgruppe herzlich bedanken. Danke für eure Hilfsbereitschaft und die großartige Arbeitsatmosphäre.

Weiters danke ich meinen Studienkollegen, die zu Freunden wurden, und mich durch diesen aufregenden Lebensabschnitt begleitet haben. Durch euch werde ich meine Studienzeit immer in guter Erinnerung behalten.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium nicht nur finanziell ermöglicht haben, sondern mich vor allem immer wieder ermutigt haben, meine Ziele zu verfolgen. Danke für eure bedingungslose Unterstützung!

Kurzzusammenfassung

Wirkstoff-haltige Nanopartikel gelten als vielversprechender Ansatz in der Therapie von Harnwegsinfektionen. Im Zuge der Masterarbeit wurden Öl-haltige Nanokapseln aus humanem Serumalbumin (HSA) mit Weizenkeimlektin (WGA) als Teil der Proteinhülle hergestellt. Zellversuche zeigten, dass Nanokapseln mit WGA als Targeter-Molekül durchwegs höhere Bindungsaffinitäten an Urothelzellen aufwiesen. Um die Problematik der zum Aufrahmen neigenden Nanokapseln zu reduzieren, wurde außerdem eine neu entwickelte Methode (Cellcube) als Alternative zu klassischen Monolayer-Versuchen eingesetzt. Dadurch konnte eine bis zu 4-fach bessere Bindung erzielt werden. Die Internalisation der Nanokapseln in die Zellen sowie die Unbedenklichkeit des Transport-Vehikels konnten ebenfalls bestätigt werden.

In weiteren Untersuchungen wurden die Wirkstoffe Trimethoprim und Rifampicin in die Nanokapseln eingebaut, wobei für Rifampicin aufgrund seiner höheren Lipophilie und Plasmaproteinbindung höhere Einbauraten erzielt werden konnten. Des Weiteren wurde gezeigt, dass ein künstliches lysosomales Medium oder die Anwesenheit von Enzymen zu einer gesteigerten Freisetzung führt. Schlussendlich wurde die Wirksamkeit der Nanokapseln gegen *E. coli* und *Staph. ssp.* mittels Minimaler Hemmkonzentration (MHK) erfolgreich getestet, wobei niedrigere MHK-Werte als mit der Wirkstoff-Lösung gleicher Konzentration erreicht wurden.

Abstract

Drug-containing nanoparticles are considered as a promising approach in the treatment of urinary tract infections. In the course of the master's thesis, oil-containing nanocapsules were made from human serum albumin (HSA) with wheat germ agglutinin (WGA) as part of the protein shell. Cell studies showed that nanocapsules with WGA as targeter consistently showed higher binding affinities to urothelial cells. To reduce the problem of nanocapsules that exhibit a tendency to creaming, a newly developed method (cellcube) was tested as an alternative to classic monolayer studies. As a result, up to 4 times better binding could be achieved. The internalization of the nanocapsules into the cells as well as the harmlessness of the drug delivery vehicle could also be confirmed.

In further experiments, the active ingredients trimethoprim and rifampicin were incorporated into the nanocapsules, whereby rifampicin was able to achieve a higher encapsulation efficiency due to its higher lipophilicity and plasma protein binding. It has also been shown that an artificial lysosomal fluid or the presence of enzymes lead to an increased release. Ultimately, the effectiveness of the nanocapsules against *E. coli* and *Staph. ssp.* was successfully tested using the minimum inhibitory concentration (MIC), whereby lower MIC values were achieved than with the active ingredient solution of the same concentration.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Harnwegsinfektionen.....	9
1.1.1	Problematik	10
1.2	Nanopartikel als neuer Therapieansatz	10
1.3	Zielsetzung der Arbeit	11
2	Material und Methoden.....	12
2.1	Verwendete Chemikalien und Materialien	12
2.2	Verwendete Geräte	14
2.3	Verwendete Puffer und Medien	15
2.4	Herstellung der Protein-Nanokapseln	16
2.5	Charakterisierung der Protein-Nanokapseln	18
2.5.1	Partikelgröße und PDI	18
2.5.2	Zetapotential	18
2.5.3	Morphologie mittels Kryoelektronenmikroskopie (Kryo-EM).....	18
2.5.4	Quantifizierung des Proteingehaltes	19
2.5.4.1	Durchführung.....	19
2.5.4.2	Erstellen einer Kalibriergeraden für HSA	19
2.6	Quantifizierung des TMP- sowie RIF-Gehaltes mittels HPLC	20
2.6.1	Vorbereitung	20
2.6.2	HPLC-Methode	20
2.6.3	Erstellen einer HPLC-Kalibriergeraden für TMP	21
2.6.4	Erstellen einer HPLC-Kalibriergeraden für RIF	21
2.6.5	Charakterisierung des Wirkstoff-Einbaus bzw. der -Beladung	22
2.7	Zellkultur	22
2.7.1	Verwendete Zelllinien	22
2.7.2	Verwendete Puffer und Medien	23
2.7.3	Subkultivierung von Zellen	23
2.7.4	Kultivierung von Zellen in 96-Well-Mikrotiterplatten	24
2.7.5	Kultivierung von Zellen auf Glas-Deckgläschen (für Cellcubes).....	24
2.8	Bindungsstudien an Zellen	24
2.8.1	Bindungsstudien an Einzelzellen mittels Durchflusszytometer (FACS).....	24
2.8.2	Bindungsstudien an Zellmonolayern in 96-Well-Mikrotiterplatten.....	25
2.8.3	Bindungsstudien an Zellmonolayern im Cellcube	25
2.8.4	Kolokalisationsstudien.....	26
2.9	MTT-Test	27
2.10	Freisetzungsstudien von TMP und RIF aus Protein-Partikeln.....	28

2.11	Wirksamkeit der TMP- und RIF-Nanokapseln.....	29
2.11.1	Nachweis mittels Agardiffusionstests	29
2.11.1.1	Probenvorbereitung.....	29
2.11.1.2	Versuchsaufbau	29
2.11.1.3	Auswertung	30
2.11.2	Nachweis mittels Minimaler Hemmkonzentration (MHK)	30
2.11.2.1	Erstellen einer Kalibriergeraden für Bakterien	30
2.11.2.2	Versuchsaufbau	31
2.11.2.3	Auswertung	32
3	Ergebnisse und Diskussion	33
3.1	Herstellung der Protein-Partikel inkl. Optimierung des Wirkstoff-Einbaus	33
3.2	Charakterisierung der Protein-Partikel.....	34
3.2.1	Partikelgröße und PDI	34
3.2.2	Zetapotential	35
3.2.3	Morphologie	36
3.2.4	Proteingehalt.....	36
3.2.5	Loading Capacity und Encapsulation Efficiency von TMP- und RIF-Proteinpartikeln	37
3.3	Bindungsstudien an unterschiedlichen Zellmodellen	40
3.3.1	Bindungsstudien an Einzelzellen mittels Durchflusszytometer.....	40
3.3.2	Bindungsstudien an Monolayern	42
3.3.3	Bindungsstudien am Cellcube	44
3.3.4	Vergleich der Bindungsstudien an Monolayern und Cellcubes	45
3.3.5	Kolokalisationsstudien.....	46
3.4	Unbedenklichkeit der Protein-Nanokapseln	49
3.5	Freisetzungsstudien von TMP und RIF aus Protein-Partikeln.....	51
3.6	Wirksamkeit der TMP- und RIF-Nanokapseln.....	55
3.6.1	Nachweis mittels Agardiffusionstests	55
3.6.2	Nachweis mittels Minimaler Hemmkonzentration (MHK)	58
4	Conclusio	63
5	Abkürzungsverzeichnis.....	65
6	Abbildungsverzeichnis.....	66
7	Tabellenverzeichnis.....	67
8	Literaturverzeichnis	68

1 Einleitung

1.1 Harnwegsinfektionen

Jährlich erkranken mehr als 150 Millionen Menschen weltweit an Harnwegsinfektionen [1]. Dabei sind Frauen achtmal häufiger betroffen als Männer. Die Inzidenz nimmt mit steigendem Alter zu und etwa 50-60 % der Frauen erleiden in ihrem Leben mindestens eine Harnwegsinfektion [2].

Bei Harnwegsinfektionen wird zwischen Cystitis und Pyelonephritis unterschieden [1]. Diese können wiederum unterteilt werden in unkomplizierte Harnwegsinfektionen bei strukturell und physiologisch unauffälligem Harntrakt sowie komplizierte Harnwegsinfektionen mit abnormalem Harntrakt. Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Schwangerschaft oder eine Immunsuppression erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer Harnwegsinfektion [2]. Auch Blasenkatheter stellen einen Risikofaktor dar. Mit 40 % ist die Katheter-assoziierte Harnwegsinfektion die häufigste nosokomial-erworbene Infektion [1].

Eine Harnwegsinfektion kann asymptomatisch oder symptomatisch verlaufen. Zu den häufigsten Symptomen zählen Dysurie, Pollakisurie, Hämaturie sowie Trübung des Harns und Schmerzen im Unterbauch. Bei komplizierten Harnwegsinfektionen dauern diese Symptome meist länger als eine Woche an, wobei zusätzlich Fieber, Schüttelfrost, Übelkeit und Erbrechen auftreten können [2].

In über 80 % der Fälle sind uropathogene *Escherichia coli* (UPEC) die Ursache der Infektion. UPEC besitzen an ihrer Oberfläche sogenannten Typ-I-Pili, welche an der Spitze das Adhäsin FimH tragen. Damit können die Bakterien an mannosylierte Proteine urothelialer Zellen binden und folglich durch Umlagerung des Zytoskeletts aufgenommen werden. Innerhalb der Zellen sind UPEC vor wirtseigenen Abwehrmechanismen sowie vor Antibiotika im Urin und Blasengewebe geschützt und können sich vermehren [3]. Werden nach einer bestimmten Zeit UPEC aus den Zellen freigesetzt, kann es zur Ausbildung eines Rezidivs kommen [2].

Als First-line Therapeutika kommen orale Antibiotika wie Nitrofurantoin, Trimethoprim-Sulfamethoxazol, Fosfomycin sowie Pivmecillinam zum Einsatz. Trotz Behandlung kommt es bei 20-30 % der Betroffenen nach einer Infektion zu einem Rezidiv [4]. In diesem Fall kann eine niedrigdosierte Antibiotika-Dauerprophylaxe über 6 Monate oder länger in Betracht gezogen werden, was jedoch hinsichtlich zunehmender Resistenzraten zu vermeiden ist [2].

1.1.1 Problematik

Bei komplexen, rezidivierenden Harnwegsinfektionen bietet die intravesikale Verabreichung von Antibiotika über einen Harnröhrenkatheter eine alternative Applikationsart zur peroralen Einnahme [5]. Durch die Instillation können systemische Nebenwirkungen reduziert werden und höhere Arzneistoff-Konzentrationen am Infektionsort erreicht werden. Da das Urothel jedoch eine der effektivsten epithelialen Barrieren des Körpers darstellt, führt dessen geringe Permeabilität zu niedrigen Wirkstoff-Konzentrationen innerhalb der Zellen und damit zu einem verminderten Effekt der intravesikalen Therapie. Hinzu kommt, dass der Körper kontinuierlich Urin produziert, wodurch der lokal applizierte Arzneistoff relativ schnell verdünnt und aufgrund unzureichender Haftung an Urothelzellen wieder ausgeschieden wird [6]. Daher braucht es innovative, bioadhäsive Formulierungen, die die Verweildauer der Wirkstoffe in der Blase verlängern sowie die Permeabilität des Urothels erhöhen, um so die Therapie bei Harnwegsinfektionen effektiver zu gestalten.

1.2 Nanopartikel als neuer Therapieansatz

Als Träger für Wirkstoffe besitzen Nanopartikel vielversprechende Eigenschaften. Neben synthetischen Polymeren wie PLGA (Polylactid-co-Glycolid) kommen als Materialien auch natürliche Biopolymere wie Albumin zum Einsatz. Durch eine intravesikale Applikation können die Nanopartikel gezielt an den Wirkort gebracht werden, wodurch dort höhere Wirkstoff-Konzentrationen erreicht werden können. Dadurch sollte die therapeutische Dosis reduziert und systemische Nebenwirkungen gesenkt werden können. Nanopartikel besitzen aufgrund ihrer Größe außerdem die Fähigkeit, leichter natürliche Barrieren zu überwinden. Zusätzlich können den Nanopartikeln Targeting-Eigenschaften verliehen werden. Durch aktive Transportmechanismen können Nanopartikel so über Erkennungsliganden an ihrer Oberfläche wie z.B. Folsäure oder auch Proteine mit Zellen interagieren [7]. Dahingehend überzeugten spezielle Glykoproteine, sogenannte Lektine. Vorangegangene Studien zeigten, dass von den untersuchten Lektinen das Weizenkeimlektin (wheat germ agglutinin, WGA) aus *Triticum vulgare* die beste Bindung an Urothelzellen erzielen konnte [8]. WGA kann dabei den Glycan-vermittelten Bindungs- und Aufnahmeprozess des UPEC-Adhäsins FimH nachahmen [5], indem es spezifisch an Zuckerstrukturen wie N-Acetyl-D-Glucosamin und Sialinsäure an der Oberfläche der urothelialen Zellen bindet [8]. Dadurch könnten WGA-modifizierte Nanopartikel nicht nur bei Harnwegsinfektionen, sondern sogar bei Blasen Tumoren einen entscheidenden Therapie-Vorteil bringen.

Zur Herstellung von Nanopartikeln gibt es neben dem „solvent evaporation“-Verfahren u. a. die Möglichkeit der Behandlung mit Hochleistungs-Ultraschall. Diese Methode kommt dabei ohne toxische Hilfsmittel aus – benötigt werden lediglich eine Protein-Lösung und eine

lipophile Phase wie Dodecan oder pflanzliche Öle. Während der Beschallung entstehen durch akustische Kavitation Hydroxyl-Radikale, welche Superoxide sowie Peroxide bilden. Diese können wiederum Cystein-Reste des Proteins oxidieren, wodurch es zur Ausbildung von Disulfidbrücken kommt [9]. Durch die damit verbundene Änderung der Proteinstruktur entstehen Nanokapseln, da sich um den Ölkern herum eine stabile Proteinhülle bildet.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollen Protein-Nanokapseln nach einem bereits optimierten Protokoll hergestellt werden [10]. Durch den Einbau des Targeter-Moleküls WGA in die Proteinhülle sollte eine bessere Bindung an Urothelzellen (5637 und SV-HUC-1) möglich sein [5, 8]. Die unterschiedliche Bindungsaffinität zwischen HSA- und HSA-WGA-Nanokapseln soll dabei anhand von unterschiedlichen Zellmodellen gezeigt werden. Wie auch andere Quellen bestätigen, neigen Nanokapseln aufgrund des enthaltenen Öls im Kern zum Aufrahmen, wobei eine erneute Redispergierung durch Schütteln möglich ist [11, 12]. Durch das Aufsteigen der Nanokapseln ist die Bindung an Zellen im Monolayer jedoch limitiert. Ein eigens in der Arbeitsgruppe entwickelter Cellcube soll dafür sorgen, dass das Aufrahmen während der Inkubationszeit minimiert und dadurch die Partikel-Adhäsion an die Zellen erhöht wird. In Bindungsstudien soll eruiert werden, ob sich diese neue Methode als Alternative zu klassischen Monolayer-Versuchen eignet. Zusätzlich soll durch Internalisationsstudien die Aufnahme der Protein-Nanokapseln in die Zellen bestätigt und durch Zellviabilitätstests die Unbedenklichkeit des Transport-Vehikels überprüft werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit besteht darin, erstmals einen Wirkstoff in die Protein-Nanokapseln einzubauen. Dazu wurden zwei Wirkstoffe ausgewählt: Trimethoprim als Antibiotikum gegen Harnwegsinfektionen sowie Rifampicin als Modellwirkstoff mit anderen Eigenschaften hinsichtlich Lipophilie und Plasmaproteinbindung. Dabei soll untersucht werden, inwieweit diese Parameter Einfluss auf die Effizienz des Einbaus haben bzw. inwieweit diese verbessert werden kann. Des Weiteren soll die Freisetzung der Wirkstoffe aus den Proteinpartikeln in unterschiedlichen Akzeptormedien überprüft werden. Die Wirkstoff-haltigen Partikel sollen außerdem auf ihre Wirksamkeit hin untersucht werden. Dazu werden mit *E. coli* und *Staph. spp.* Agardiffusionstests angelegt sowie die Minimale Hemmkonzentration der Nanokapseln bestimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien und Materialien

3Dee Store OG (Wien, Österreich)	– Cellcube
American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA)	– 5637-Zellen – SvHuc-Zellen
AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)	– $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
Amicon Inc. (Beverly, MA, USA)	– Centricon-10 Zentrifugen-Filtereinheit (10 000 MW cut-off)
BioMedica Medizinprodukte GmbH (Wien, Österreich)	– EZ4U: Nichtradioaktiver Proliferations- und Zytotoxizitätstest
Biowest (Nuaillé, Frankreich)	– Penicillin-Streptomycin Solution 100x
Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	– Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) – HEPES (Pufferan® ≥ 99,5 %, Buffer Grade) – Gentamycinsulfat – Glycin (Pufferan® ≥ 99 %, p.a.) – Natriumchlorid ≥ 99 %, Ph. Eur., USP – Natriumhydroxid ≥ 98 %, p.a., ISO, in Plätzchen – SDS, ultra pure, ≥ 99,5 %
Ciro Manufacturing Corporation (Deerfield Beach, FL, USA)	– Mikro-Zentrifugenfilter-Einsatz (800 µl Kapazität, 0,2 µm PVDF-Membran)
E. Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)	– Ammoniumchlorid – D(+)-Glucose-Monohydrat – HSA (Human Serum Albumin, Fraction V) – K_2HPO_4 – L-Glutamin – Pronase E (from Streptomyces griseus)
Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG (Sondheim, Deutschland)	– Deckgläser 8 x 8 mm

Greiner bio-one GmbH (Kremsmünster, Österreich)	– 75 cm² Gewebekulturflaschen – Microplatten, 96 well, Polystyrene, flacher Boden, transparent, steril – Zellkultur Multiwellplatte, 24 well, Polystyrene, transparent
Mediatech, Inc. (Manassas, VA, USA)	– Corning® FBS (Fetal Bovine Serum)
MP Biomedical LLC (Solon, Ohio, USA)	– Olivenöl
Riedel-de-Haen (Seelze, Deutschland)	– KCl – Na₂HPO₄*2 H₂O
Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)	– flexiPERM® micro12
Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	– Hefe-Extrakt – KH₂PO₄ – Kolliphor® P 188 (Lutrol® F68, Poloxamer 188; Pluronic®) – Na₃-Citrat*2 H₂O – Natriumpyruvat, ReagentPlus® ≥ 99 % – Natriumsulfat – MgCl₂*6 H₂O – Paraformaldehyd – Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut – Rifampicin – RPMI-1640 – Trimethoprim – Trypsin-EDTA Solution 0,25 %
Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)	– Fluka™ Ameisensäure – Fluka™ Milchsäure – gibco™ Ham's F-12K Nut Mix (1X) (Nutrient Mixture Kaighn's Modification) – Invitrogen™ BodiPy™ 493/503 – Micro BCA™ Protein Assay Kit

Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, USA)	– Weizenkeimlektin von <i>Triticum vulgare</i> (WGA = wheat germ agglutinin)
VWR International S.A.S. (Fontenay-sous-Bois, FR)	– 2-Propanol $\geq 99,9\%$ – Acetonitril – Methanol

2.2 Verwendete Geräte

Analytische HPLC	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA): – HPLC: Dionex® UltiMate 3000 – Säule: Acclaim™ 120 C18 Reversed-Phase – Detektor: UV-vis-Detektor – Software: Chromeleon™
Durchflusszytometer	Beckman Coulter Inc. (Indianapolis, IN, USA): Gallios™ Flow Cytometer (561 Laser)
Partikelgrößenmessgerät	Malvern Instruments Ltd. (Worcestershire, UK): – Zetasizer Nano ZS – Mastersizer 3000 inkl. Hydro SV Nassdispergiereinheit
Lyophilisator	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode am Harz, GER): Alpha 1-4 LDplus
McFarland-Densitometer	Grant Instruments (Cambridge, UK): Grant Instruments™ Grant Bio™ DEN-1
Mikroskop Fluoreszenz	Carl Zeiss (Oberkochen, GER): Epifluorescence Axio Observer.Z1 deconvolution microscopy system
Plattenrotator	Liofilchem® s.r.l. (Roseto degli Abruzzi, IT): Rotating Plate Inoculator
Microplate-Reader (Fluoreszenz und Absorption)	TECAN (Männerdorf, Schweiz): Infinite M200 Pro
Rotationsschüttler inkl. Drehscheibe	Cole Parmer (Staffordshire, UK): Stuart Rotator SB3

Ultraschall-Homogenisator	Bandelin electronic GmbH & Co. KG (Berlin, Deutschland): Sonoplus HD2070
UV-Crosslinker	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, GER): UVP CL-1000 Longwave Crosslinker
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA): Sorvall Lynx 6000 Centrifuge

2.3 Verwendete Puffer und Medien

Die verwendeten Puffer werden hergestellt, indem folgende Bestandteile in je 1 Liter Aqua dest. gelöst und anschließend sterilfiltriert werden.

- 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8,0: 16,282 g K_2HPO_4 + 0,888 g KH_2PO_4
- 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 5,44: 1,017 g K_2HPO_4 + 12,814 g KH_2PO_4
- Pluronic® 1% (m/v): 10 g Kolliphor® P 188
- 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4 isoton: 4,77 g HEPES + 8 g NaCl
- Phosphat buffered saline (PBS)-Stammlösung (10 x) pH 7,2-7,3:
80 g NaCl + 2 g KCl + 7,65 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ + 2 g KH_2PO_4
- PBS (Arbeitslösung): 1:10-Verdünnung der PBS-Stammlösung (10 x) mit Aqua dest.
- 3 mM PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ pH 7,2-7,3:
50 ml CaCl_2 -Stammlösung (2,65 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 1 L Aqua dest.) + 0,2 g KCl + 0,2 g KH_2PO_4 + 0,1 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ + 8,0 g NaCl + 0,764 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

Des Weiteren werden zur Durchführung der Freisetzungsstudien (Abschnitt 2.10) nachstehende Akzeptormedien hergestellt, indem folgende Bestandteile in je 500 ml Aqua dest. gelöst und anschließend sterilfiltriert werden.

- 150 mM HEPES/NaOH pH 7,4 mit 0,1 % Pronase E: 17,873 g HEPES
Vor Versuchsbeginn werden 0,1 % Pronase E in der entsprechenden Menge Puffer gelöst.

- Künstliche lysosomale Flüssigkeit (artificial lysosomal fluid, ALF):
 53,4 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ + 1,605 g NaCl + 44,5 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ + 19,5 mg Na_2SO_4 +
 55,1 mg CaCl_2 + 3 g NaOH + 10,4 g Citronensäure + 29,5 mg Glycin + 38,5 mg
 $\text{Na}_3\text{-Citrat} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ + 10,0 ml $\text{Na}_2\text{-Tartrat} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ (hergestellt aus 37,95 mg Weinsäure
 gepulvert + 15,5 mg NaOH in 10 ml Aqua dest.) + 10,0 ml Na-Lactat (hergestellt aus
 280 μl Milchsäure + 15,0 mg NaOH in 10 ml Aqua dest.) + 43,0 mg Na-Pyruvat.
 Anschließend wird der pH-Wert auf 4,5 eingestellt [13].

Die für die Bakterienkultur verwendete Standard-1-Nährbouillon wird hergestellt, indem folgende Bestandteile in 1 Liter Aqua dest. unter Erwärmen gelöst werden, der pH-Wert auf 7,5 eingestellt und die Nährbouillon anschließend autoklaviert wird: 15,0 g Casein-Pepton + 3,0 g Hefe-Extrakt + 6,0 g NaCl + 1,0 g Glucose [14].

2.4 Herstellung der Protein-Nanokapseln

Die Herstellungsmethode der Protein-Nanokapseln orientiert sich an dem Protokoll von Rollett et. al [15].

Zur Herstellung von HSA-Protein-Nanokapseln werden 20 mg HSA eingewogen, die danach in 10 ml eines 100 mM Kaliumphosphat-Puffers pH 8,0 gelöst werden. Anschließend wird 1 ml Olivenöl hinzugegeben. Das Zwei-Phasen-System wird auf dem Magnetrührer auf 40 °C temperiert. Nach Erreichen der erforderlichen Temperatur kann die Mischung in einen 25 ml-Messzylinder überführt werden. Es folgt eine Beschallung mittels Ultraschallsonde (Sonoplus HD2070, Bandelin, GER), wobei die Spitze der Sonotrode zwischen der Grenzfläche der lipophilen und der hydrophilen Phase positioniert wird. Die Einstellung wird dabei so gewählt, dass 2 Minuten mit einer Power von 100 % sowie einer Pulsation von 40 % beschallt wird.

Die resultierende Partikelsuspension wird in ein 12 ml-Zentrifugen-Tube überführt und zentrifugiert (5 204 x g, 40 min, 4 °C). Die geringe Dichte des Öl-haltigen Kerns der Nanokapseln führt nach dem Zentrifugieren dazu, dass die Partikel aufräumen. Der Unterstand wird mit einer 5 ml-Spritze entnommen, indem das Partikelpellet mit der Kanüle durchstoßen wird. Das im Zentrifugen-Tube zurückbleibende Partikelpellet wird danach mit Pluronic® 1 % (m/v) auf das ursprüngliche Volumen von 11 ml aufgefüllt. Anschließend wird die Partikelsuspension durch Schütteln homogenisiert. Dieser Waschschrift erfolgt weitere drei Mal.

Nach der letzten Homogenisierung der Partikelsuspension wird diese in einen Scheidetrichter überführt und etwa 20 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird die untere

Phase bestehend aus den finalen Protein-Nanokapseln abgelassen, wodurch unverkapselte Öl-Reste sowie zu große Partikel abgetrennt werden.

Zur Herstellung von HSA-WGA-Nanopartikeln werden 3,6 mg WGA und 16,4 mg HSA verwendet, was einem molaren Verhältnis von 1:2 entspricht. Die weitere Herstellung erfolgt wie zuvor beschrieben.

Werden die Protein-Nanokapseln nachfolgend für Bindungs- sowie Kolokalisationsstudien an Zellen verwendet, wird zur Detektion der Partikel ein lipophiler Fluoreszenzfarbstoff (BodiPy™ 493/503) eingebaut. Dazu werden 50 µg des Farbstoffs in 100 µl Isopropanol gelöst und 1 ml Olivenöl hinzugefügt. Das nun fluoreszierende Olivenöl kann wie bereits beschrieben für die Herstellung der Protein-Nanokapseln verwendet werden.

Zur Herstellung von Wirkstoff-haltigen Nanokapseln mit Trimethoprim (TMP) bzw. Rifampicin (RIF) werden folgende modifizierte Herstellungsmethoden verwendet:

Um den lipophilen Wirkstoff in den Kern einzubauen, wird dieser zunächst unter Beschallen im Ultraschallbad in Isopropanol gelöst. Anschließend wird 1 ml Olivenöl hinzugegeben und unter Rühren das Isopropanol vollständig mit Druckluft abgedampft. Diese Wirkstoff-Öl-Mischung wird nun getrennt von der Protein-Puffer-Lösung auf 40 °C erwärmt, um das Auswaschen des Wirkstoffes aus dem Öl in den Puffer zu minimieren. Die beiden erwärmten Lösungen werden erst kurz vor Beschallen mit der Ultraschallsonde in der 25 ml-Mensur vereint. Die weitere Vorgehensweise folgt dem Herstellungsprotokoll für Protein-Nanokapseln ohne Wirkstoff.

Um zu überprüfen, ob sich die Wirkstoffe aufgrund der Plasmaproteinbindung an HSA binden lassen, werden Nanokapseln wie folgt hergestellt: Der eingewogene Wirkstoff wird gemeinsam mit der HSA-Puffer-Lösung für 30 Minuten auf dem Magnetprüher gerührt. Danach wird 1 ml Olivenöl hinzugefügt und wie beschrieben Partikel hergestellt.

Des Weiteren werden als Kontrolle RIF-Partikel mit einem 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 5,44 hergestellt, da bei einem pH-Wert < 6 Rifampicin schlecht löslich ist [16].

2.5 Charakterisierung der Protein-Nanokapseln

2.5.1 Partikelgröße und PDI

Zur Bestimmung des durchschnittlichen Partikeldurchmessers und des Polydispersitätsindex¹ (PDI) wird der Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., UK) verwendet. Dieser nutzt für die Messung die dynamische Lichtstreuung (DLS).

Nach Homogenisieren der Partikelsuspension werden 800 µl luftblasenfrei in eine Küvette transferiert und die Dreifachbestimmung bestehend aus mehreren Einzelmessungen gestartet.

Der ermittelte PDI kann einen Wert zwischen 0 und 1 annehmen und ist ein Maß für die Größenverteilung. Ein Wert von 0 bedeutet dabei, dass eine monodisperse Suspension vorliegt [17]. Für die vorliegenden Protein-Nanokapseln wird ein $PDI \leq 0,2$ angestrebt, um eine möglichst einheitliche Partikelgröße zu gewährleisten.

Zur Bestimmung der Partikelgröße von Protein-Nanokapseln über 1000 nm wird der Mastersizer 3000 (Malvern Instruments Ltd., UK) verwendet. Das Prinzip der Messung beruht auf der Laserdiffraktometrie.

Zunächst wird die Messzelle mit Aqua dest. partikelfrei befüllt und mit einem Magnetührstäbchen versehen. Es folgt die Initialisierung des Gerätes sowie eine Hintergrundmessung. Danach werden 2 µl der Partikelsuspension in die Messzelle pipettiert und mit einer Rührgeschwindigkeit von 700 UpM gerührt.

Es werden 5 Messungen durchgeführt, wobei die Software den Parameter $D[4;3]$ – den volumengewichteten mittleren Durchmesser der Partikel – angibt [18].

2.5.2 Zetapotential

Zur Messung des Zetapotentials wird ebenfalls der Zetasizer Nano ZS eingesetzt. Es werden 1:4- bzw. falls erforderlich 1:8-Verdünnungen in Pluronic® 1 % (m/v) bereitet, da sonst die Konzentration zu hoch ist, um aussagekräftige Messergebnisse zu erhalten. Etwa 800 µl der verdünnten Partikelsuspension werden luftblasenfrei in eine U-förmige Messzelle gefüllt und verschlossen. Es folgt eine Dreifachbestimmung bestehend aus mehreren Einzelmessungen.

2.5.3 Morphologie mittels Kryoelektronenmikroskopie (Kryo-EM)

Zur Untersuchung der Morphologie werden die Protein-Nanokapseln mittels Kryoelektronenmikroskopie analysiert.

2.5.4 Quantifizierung des Proteingehaltes

Um die Menge des Proteins, das die Hülle der Nanokapseln bildet, bestimmen zu können, wird das Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) genutzt. Bei Vorliegen von Protein in der Probe erfolgt eine Reduktion von zweiwertigem Kupfer (Cu^{2+}) zu einwertigem Kupfer (Cu^{1+}). Durch Chelatbildung der Bicinchoninsäure (BCA) mit 2 Molekülen einwertigem Kupfer entsteht eine violette Färbung. Diese korreliert mit der Proteinmenge und kann bei 562 nm am TECAN photometrisch vermessen werden [19].

2.5.4.1 Durchführung

Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration werden 200 µl der Partikelsuspension lyophilisiert. Dadurch wird die Proteinhülle der Nanokapseln zerstört und die Bestimmung des Proteinanteils ist möglich.

Die gefriergetrockneten Proben werden im ursprünglichen Volumen Aqua dest. aufgenommen und 10 Minuten im Ultraschallbad homogenisiert. Danach werden die Proben 1:50 mit Pluronic® 1 % (m/v) verdünnt, damit die Werte auf der Kalibriergeraden liegen. Nach erneutem Homogenisieren werden 150 µl der Verdünnung mit 150 µl der Arbeitslösung als Dreifachbestimmung auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte aufgetragen. Die Arbeitslösung wird nach Herstellerangaben [19] aus 25 Teilen Reagenz A (basischer Tartrat-Carbonat-Puffer) [20], 24 Teilen Reagenz B (Bicinchoninsäure-Lösung) [21] sowie 1 Teil Reagenz C (Kupfersulfat-Lösung) [22] zubereitet.

Anschließend wird die Platte zum Schutz vor Verdunstung mit einer Folie abgedichtet und im TECAN zuerst 30 Sekunden geschüttelt und weitere 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wird die Folie abgezogen und am TECAN die Absorption bei 562 nm gemessen.

2.5.4.2 Erstellen einer Kalibriergeraden für HSA

Um den Proteingehalt der Partikel zu quantifizieren, wird eine Kalibriergerade benötigt. Es wird eine 1 mg/ml Stammlösung von HSA in Pluronic® 1 % (m/v) bereitet und diese 1:2 mit Pluronic® 1 % (m/v) verdünnt. Die Verdünnungen werden anschließend wie in Abschnitt 2.5.4.1 beschrieben mit der Arbeitslösung inkubiert und anschließend am TECAN die Absorption bestimmt.

Laut Herstellerangaben können im Bereich von 2 bis 40 µg/ml Protein lineare Werte erreicht werden [19]. Die erstellte Kalibriergerade deckt den Bereich zwischen 1,95 und 62,5 µg/ml ab (Abbildung 1).

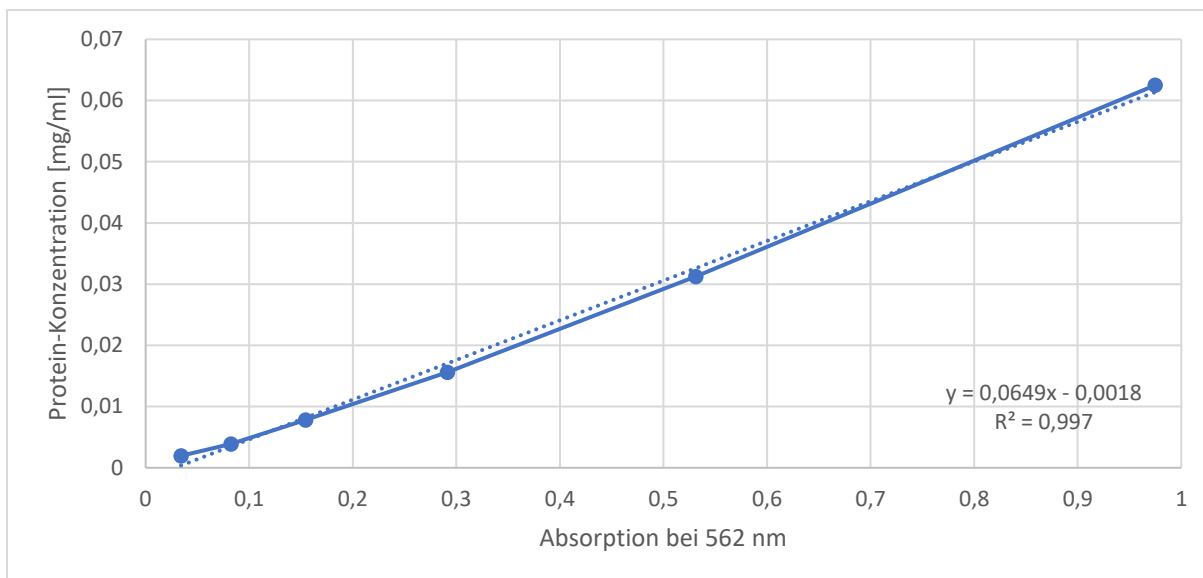


Abbildung 1: Kalibriergerade von HSA in Pluronic® 1 % (m/v) bei 562 nm.

2.6 Quantifizierung des TMP- sowie RIF-Gehaltes mittels HPLC

2.6.1 Vorbereitung

Zur Vorbereitung der Proben werden zunächst 500 µl der Partikelsuspension lyophilisiert. Die gefriergetrockneten Partikel werden in kaltem Methanol (MeOH) aufgenommen, damit das Protein gefällt wird. Danach folgen 10 Minuten im Ultraschallbad, um den Wirkstoff vollständig im MeOH zu lösen. Zur Abtrennung des gefällten Proteins werden die Proben anschließend zentrifugiert (20 817 x g, 10 min, 4 °C). Vom Überstand werden nun 100 µl abgehoben und mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography) analysiert.

2.6.2 HPLC-Methode

Zur HPLC-Analyse wird der Dionex® UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA) eingesetzt. Die analytische HPLC-Säule (Acclaim™ 120 C18 RP, Thermo Fisher Scientific, USA) wird dazu auf 30 °C temperiert und eine Flussrate von 0,5 ml/min eingestellt. Je Probe werden 5 µl injiziert, wobei eine Dreifachbestimmung durchgeführt wird.

Als Elutionsmittel werden sowohl für TMP als auch für RIF Aqua dest. partikelfrei/0,1 % (v/v) Ameisensäure (H₂O/FA) sowie Acetonitril/0,1 % (v/v) Ameisensäure (ACN/FA) verwendet. Die Elution erfolgt dabei mittels binärem Gradienten. Bei der TMP-Quantifizierung liegt anfangs ein Eluentengemisch von 99:1 (H₂O/FA – ACN/FA) vor, wobei das Verhältnis innerhalb von 10 Minuten zu 1:99 übergeht und 1 Minute anhält. In 5 weiteren Minuten stellt sich das Mischungsverhältnis wieder auf den Ausgangswert ein. Bei der RIF-Quantifizierung besteht zu

Beginn ein Verhältnis von 70:30 (H₂O/FA – ACN/FA), das sich auch hier während der Analysenzeit umdreht.

Die Detektion von TMP mittels UV-vis-Detektor erfolgt bei einer Wellenlänge von 280 nm und einer Retentionszeit von etwa 5 Minuten. RIF wird bei einer Wellenlänge von 330 nm und einer Retentionszeit von etwa 8 Minuten erfasst.

2.6.3 Erstellen einer HPLC-Kalibriergeraden für TMP

Zur Berechnung des TMP-Gehaltes in der Probe ist zunächst eine Kalibriergerade notwendig. Dazu wird als externer Standard eine definierte Menge TMP in 1 ml MeOH gelöst und aus dieser Lösung 1:2-Verdünnungen bereitet. Die Analyse jeder Verdünnungsstufe erfolgt wie in Abschnitt 2.6.2 beschrieben als Dreifachbestimmung. Die erstellte Kalibriergerade deckt den Bereich zwischen 0,70 und 90 µg/ml TMP ab (Abbildung 2).

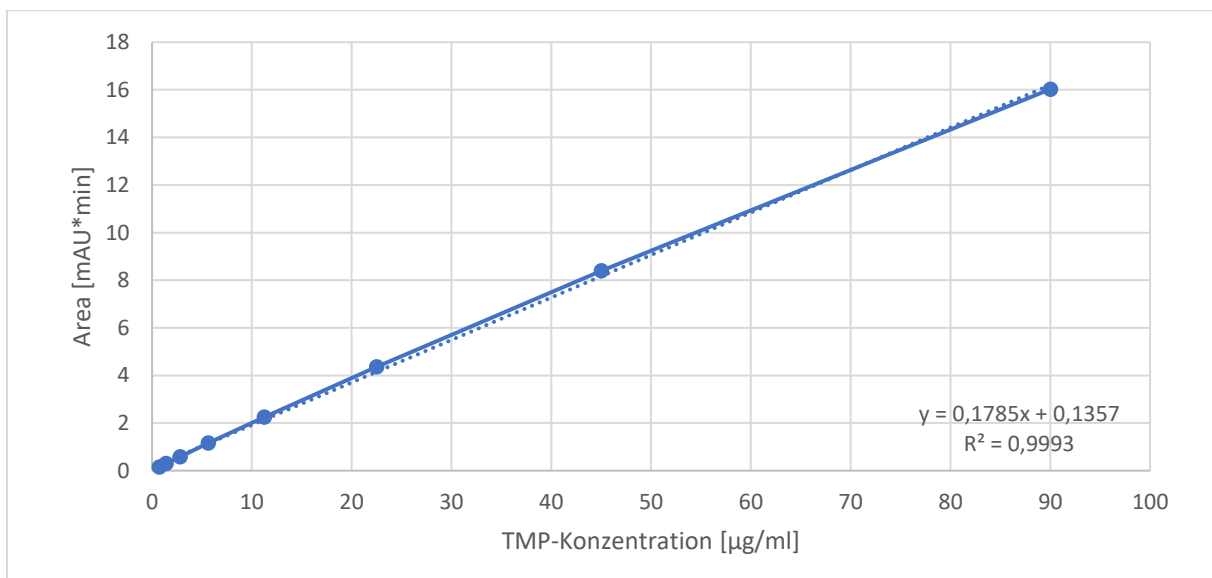


Abbildung 2: HPLC-Kalibriergerade von Trimethoprim bei 280 nm.

2.6.4 Erstellen einer HPLC-Kalibriergeraden für RIF

Das Erstellen der Kalibriergeraden für RIF erfolgt analog zur Vorgehensweise in Abschnitt 2.6.3, wobei hier Verdünnungen aus 2 Teilen RIF-Lösung und 1 Teil MeOH bereitet werden. Die erstellte Kalibriergerade deckt den Bereich zwischen 11,71 und 88,89 µg/ml RIF ab (Abbildung 3).

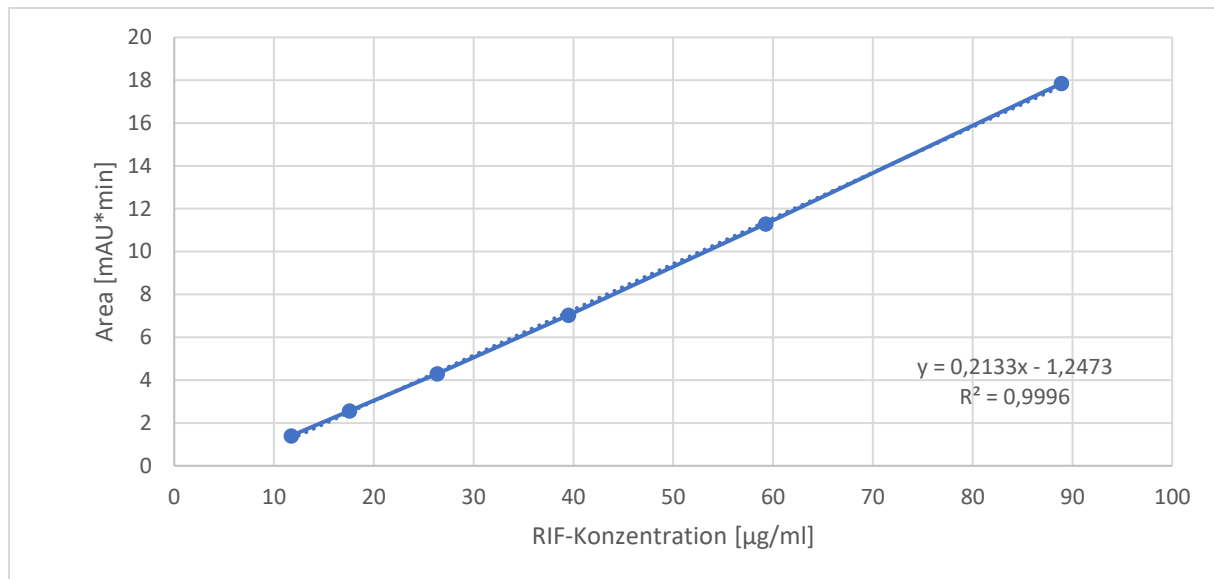


Abbildung 3: Kalibriergerade von Rifampicin bei 330 nm.

2.6.5 Charakterisierung des Wirkstoff-Einbaus bzw. der -Beladung

Um den Wirkstoff-Gehalt zu charakterisieren und die Nanokapseln miteinander zu vergleichen, werden die Loading Capacity (LC [%]) und die Encapsulation Efficiency (EE [%]) berechnet. Dazu werden die mittels HPLC ermittelten Wirkstoff-Konzentrationen sowie die mittels BCA-Assay ermittelten Protein-Konzentrationen der Nanokapseln herangezogen.

$$LC [\%] = \frac{\text{Wirkstoffgehalt der Nanokapseln [mg/ml]}}{\text{Proteingehalt der Nanokapseln [mg/ml]}} * 100$$

$$EE [\%] = \frac{\frac{\text{Wirkstoffgehalt der Nanokapseln [mg/ml]}}{\text{Proteingehalt der Nanokapseln [mg/ml]}}}{\frac{\text{eingesetzte Wirkstoffmenge [mg]}}{\text{eingesetzte Proteinmenge [mg]}}} * 100$$

2.7 Zellkultur

2.7.1 Verwendete Zelllinien

Für die Durchführung der Zellversuche werden folgende Zelllinien (American Type Culture Collection, Rockville, USA) verwendet:

- 5637: Urothelzellen eines humanen Harnblasenkarzinoms Grad 2
- SV-HUC-1: immortalisierte, humane Urothelzellen

Für die Versuche kamen 5637-Zellen zwischen den Passagen 70 und 85 sowie SV-HUC-1-Zellen zwischen den Passagen 50 und 71 zum Einsatz.

2.7.2 Verwendete Puffer und Medien

- PBS/0,1 % EDTA

Der Puffer wird hergestellt, indem 1 g EDTA in 900 ml Aqua dest. gelöst wird. Danach werden 100 ml PBS-Stammlösung (10 x) pH 7,2-7,3 hinzugegeben und der Puffer sterilfiltriert.

- RPMI (Roswell Park Memorial Institute)-1640-Medium

Zur Kultivierung von 5637-Zellen wird RPMI-1640-Medium verwendet. Dieses wird hergestellt, indem ein Fläschchen RPMI-1640-Pulver in etwa 800 ml Aqua dest. gelöst wird. Danach wird der pH-Wert mit 4M HCl auf 4,0 eingestellt und 2 g NaHCO₃ hinzugegeben. Der pH-Wert wird anschließend mit 4M NaOH auf etwa 7,2 eingestellt und 100 ml FBS (Fetal Bovine Serum), 400 µl L-Glutamin (200 mM) sowie 2 ml Gentamycin-Lösung (110,01 mg/ml) hinzugefügt. Die Mischung wird mit Aqua dest auf 1 Liter aufgefüllt und sterilfiltriert.

- Nutrient Mixture F-12 Ham Kaighn's Modification (F-12K)-Medium

SV-HUC-1-Zellen werden in F-12K-Medium kultiviert. Dieses wird hergestellt, indem 1 Liter F-12K-Medium mit 100 ml FBS, 10 ml PenStrep sowie 0,146 g L-Glutamin gemischt und anschließend sterilfiltriert wird.

- farbloses RPMI

Zur Durchführung des MTT-Tests (Abschnitt 2.9) wird farbloses Medium gebraucht. Dazu werden alle Bestandteile außer Phenolrot laut Herstellerangaben [23] abgewogen, gelöst und anschließend RPMI wie zuvor beschrieben hergestellt.

2.7.3 Subkultivierung von Zellen

Die Zelllinien werden in einer Gewebekulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² (Greiner bio-one, AT) kultiviert. Sobald die Zellen eine Konfluenz von etwa 80 % erreicht haben, kann unter sterilen Bedingungen das Passagieren der Zellen erfolgen. Dazu wird das verbrauchte Medium mittels Vakuum-Pasteurpipette abgesaugt und mit 2 ml PBS/0,1 % EDTA gewaschen, um tote Zellen und Reste des Mediums zu entfernen. Nach erneutem Absaugen des Puffers werden 2 ml Trypsin/EDTA hinzugegeben und im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂/95 % Luftatmosphäre) für 15 Minuten inkubiert. Die nun abgelösten Zellen werden in 10 ml des jeweiligen Mediums (5637: RPMI-1640; SV-HUC-1: F-12K) aufgenommen und resuspendiert. Danach wird die Zellsuspension zentrifugiert (1000 UpM, 5 Minuten, Raumtemperatur). Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet in 2 ml Medium homogen resuspendiert. In einer Gewebekulturflasche werden 10 ml Medium vorgelegt, einige Tropfen der Zellsuspension ausgesät und im Brutschrank kultiviert, bis sich erneut ein dichter Zellrasen gebildet hat.

2.7.4 Kultivierung von Zellen in 96-Well-Mikrotiterplatten

Nach dem Passagieren und Zählen der Zellen mithilfe einer Bürker-Türk-Zählkammer werden die Zellen soweit mit Medium verdünnt, dass pro Well 160 µl Zellsuspension mit 17 000 Zellen aufgetragen werden können. Danach werden die Platten im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂/95 % Luftatmosphäre) inkubiert, bis eine Konfluenz von 90 bis 100 % erreicht ist. Dies geschieht je nach Zelllinie nach 3 bis 7 Tagen.

Die gleiche Vorgehensweise wird gewählt, wenn Zelllayer im flexiPERM® (Sarstedt AG & Co., GER) für Kolokalisationsstudien angezüchtet werden.

2.7.5 Kultivierung von Zellen auf Glas-Deckgläschen (für Cellcubes)

Für die Durchführung von Cellcube-Versuchen müssen die Zellen auf speziell angefertigten 8 x 8 mm kleinen Deckgläschen kultiviert werden. Dazu wird unter sterilen Bedingungen je ein Deckgläschen in eine Kavität einer 24-Well-Mikrotiterplatte gelegt. Die Zellsuspension wird in diesem Fall auf 136 000 Zellen/ml Medium verdünnt, pro Well wird 1 ml davon eingesetzt. Auch hier werden die Platten im Brutschrank bis zur Konfluenz der Zellen inkubiert.

2.8 Bindungsstudien an Zellen

Vor jedem Zellversuch wird die benötigte Menge der Partikelsuspension zentrifugiert (5 204 x g, 10 min, 4 °C), mit einer Kanüle die klare Flüssigkeit von unten abgenommen und auf 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4 isoton umgepuffert. Dadurch wird für ein physiologisches Milieu gesorgt.

Zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit zwischen den Partikel-Chargen werden die HSA- und HSA-WGA-Partikel anschließend auf die gleiche Fluoreszenzintensität eingestellt. Zusätzlich werden von den Partikelsuspensionen mehrere Verdünnungen angefertigt.

Um nur die Bindung an die Zellen zu untersuchen und eine aktive Aufnahme in die Zellen zu minimieren, werden die Zellen konstant auf 4 °C gekühlt, indem auf Kühlelementen gearbeitet wird.

2.8.1 Bindungsstudien an Einzelzellen mittels Durchflusszytometer (FACS)

Zur Überprüfung der Bindung von HSA- und HSA-WGA-Partikeln an Einzelzellen werden Messungen mit dem BeckmanCoulter-Durchflusszytometer (Gallios, USA) durchgeführt. Dazu wird die Zellsuspension auf 4-5 Millionen Zellen/ml mit dem entsprechenden Medium eingestellt und für 30 Minuten auf 4 °C gekühlt. Danach werden 150 µl der Zellsuspension mit

150 µl der Partikelsuspension für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert. Nach Ende der Inkubation werden 900 µl PBS in FACS-Tubes vorgelegt und mit 100 µl der Zell-Partikel-Mischung versetzt. Danach folgt die Messung der zellgebundenen Fluoreszenz bei 485/525 nm (Ex/Em).

2.8.2 Bindungsstudien an Zellmonolayern in 96-Well-Mikrotiterplatten

Sobald der Zellmonolayer konfluent gewachsen ist, kann die Mikrotiterplatte auf 4 °C abgekühlt werden. Danach wird zuerst das verbrauchte Nährmedium mit einer Vakuum-Pasteurpipette entfernt und der Monolayer mit 100 µl kaltem PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ pH 7,2 gewaschen. Nach erneutem Absaugen des Puffers werden 50 µl der Partikelsuspension als Dreifachbestimmung aufgetragen. Für die Negativkontrolle (Zellen ohne Partikel) wird die Partikelsuspension durch 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4 isoton ersetzt.

Zur Bestimmung der 100 %-Werte wird vor der Inkubation am TECAN die Fluoreszenz bei einer Exzitation von 485 nm und einer Emission von 525 nm ermittelt. Anschließend werden die Zellen für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wird der Monolayer zwei Mal mit PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ pH 7,2 gewaschen. Am Ende werden 50 µl 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4 isoton in jedes Well pipettiert und erneut die relative Fluoreszenzintensität am TECAN bestimmt.

2.8.3 Bindungsstudien an Zellmonolayern im Cellcube

Nach Erreichen der Konfluenz werden die Deckgläser mithilfe einer Präpariernadel und einer Pinzette aus den Wells gehoben und mit der Zellseite nach innen in den Cellcube (Abbildung 4) gesteckt. Der Würfel mit den vier Deckgläschen fasst ein Volumen von 1,2 ml.

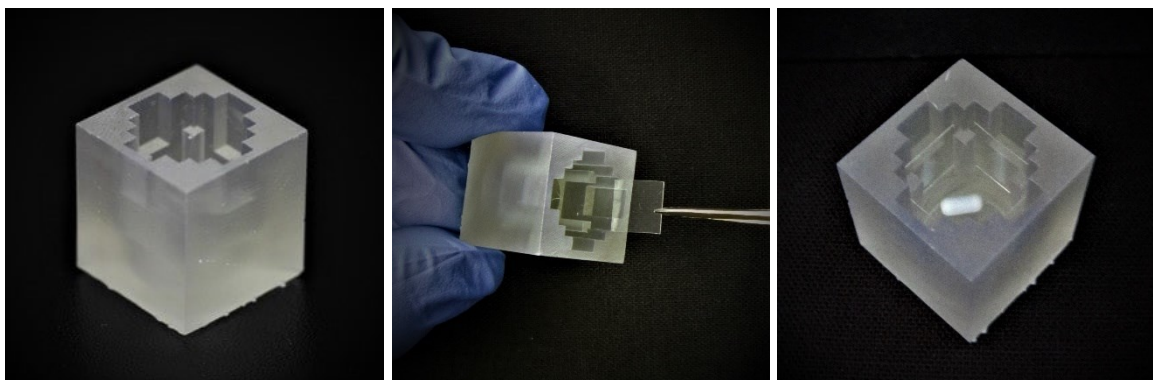


Abbildung 4: Cellcube (links). Einsetzen eines Deckgläschen in den Cellcube (Mitte). Fertiger Cellcube mit Magnetrührstäbchen (rechts).

Zunächst werden die Zellen gewaschen, indem der Cube mit 1,2 ml kaltem PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ pH 7,2 befüllt und für 30 Minuten auf 4 °C gekühlt wird. Danach wird der Puffer mit einer Pipette entfernt und durch 1,2 ml der Partikelsuspension ersetzt. Ein kleines Magnetrührstäbchen am Boden des Cellcubes sorgt für die Bewegung der Partikelsuspension. Unter Rühren wird der Cube für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert. Zusätzlich zu den Cubes mit Partikelsuspension wird ein Blank-Cube mit 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4 isoton als Leerwert mitbehandelt.

Nach der Inkubation wird die Partikelsuspension mit einer Pipette entnommen und der Cube analog zu den Monolayer-Versuchen zwei Mal mit PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ pH 7,2 gewaschen. Anschließend werden die Deckgläschen mit einer Pinzette aus dem Cube genommen und auf einer speziell angefertigten TECAN-Platte positioniert. Nach Zusatz von 20 µl 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4 isoton wird die relative Fluoreszenzintensität (485/525 nm) am TECAN gemessen.

Zur Ermittlung von 100 %-Werten wird zunächst das Medium aus den Kavitäten der 24-Well-Platte mit einer Pipette entfernt und die Deckgläschen mit 1 ml PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ pH 7,2 gewaschen. Danach werden die Deckgläser aus den Wells gehoben und auf die TECAN-Platte gelegt. Anschließend werden 20 µl der Partikelsuspension als Dreifachbestimmung auf die Deckgläser pipettiert und die Fluoreszenz am TECAN gemessen.

2.8.4 Kolokalisationsstudien

Um die Bindung der Protein-Nanokapseln an die Zellen sowie deren Internalisierung in die Zellen optisch darzustellen, werden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit dem Zeiss Epifluorescence Axio Observer.Z1 deconvolution microscopy system (Carl Zeiss, GER) erstellt. Dazu wird der Zellkern mit dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff HOECHST 33342 blau und die Zellmembran mit Alexa-markiertem WGA (aWGA) rot gefärbt.

Die verwendeten HSA- und HSA-WGA-Nanokapseln werden ebenso wie bei den Bindungsstudien auf 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4 isoton umgepuffert und auf die gleiche Fluoreszenzintensität eingestellt.

Zur Färbung von Einzelzellen wird die nach der Subkultivierung verbliebene Zellsuspension zunächst auf 12 Millionen Zellen/ml konzentriert. Davon werden 10 µl mit 20 µl der Nanokapseln sowie 3 µl HOECHST 33342 (0,5 mg/ml) gemischt. Es folgt eine einstündige Inkubation bei 4 °C bzw. 37 °C, wobei die bei 37 °C inkubierte Zellsuspension danach wieder auf 4 °C abgekühlt werden muss. Anschließend werden 10 µl aWGA (0,1 mg/ml) zugegeben und für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Mit 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4 isoton wird auf 2 ml

aufgefüllt und die Mischung zentrifugiert (1000 UpM, 5 min, 4 °C). Ein Überstand von 1,9 ml wird abgenommen und der Rückstand mit 100 µl 4 % Paraformaldehyd-Lösung homogen resuspendiert, um die Zellen zu fixieren. Nach einer weiteren zehnminütigen Inkubation bei 4 °C folgt die Zugabe von 200 µl Ammoniumchlorid-Lösung (100 mM), um die nicht benötigten Aldehyd-Gruppen des Paraformaldehyds zu blockieren. Es wird erneut mit 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4 isoton gewaschen und 1,9 ml des Überstands entfernt. Im Rückstand liegen die gefärbten Zellen vor, die nun mikroskopisch betrachtet werden können.

Die Färbung von Zellmonolayern im flexiPERM® erfolgt, sobald diese annähernd konfluent sind. Zur Darstellung der Bindung müssen die Monolayer zunächst auf 4 °C gekühlt werden. Danach werden diese mit 100 µl kaltem PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ pH 7,2 gewaschen. Nach Zugabe von 50 µl der Nanokapseln sowie 4 µl HOECHST 33342 (0,5 mg/ml) werden die Zelllayer für 1 Stunde bei 4 °C bzw. 37 °C inkubiert. Analog zur Färbung von Einzelzellen werden die Monolayer auf 4 °C abgekühlt und danach 10 µl aWGA (0,1 mg/ml) zugegeben. Nach einer Inkubation von etwa 15 Minuten wird der Zelllayer mit 100 µl PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ pH 7,2 gewaschen. Es werden erneut 50 µl PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ pH 7,2 sowie 50 µl 4 % Paraformaldehyd-Lösung hinzugefügt und 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Danach werden 100 µl Ammoniumchlorid-Lösung (100 mM) zugesetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen des Monolayers mit 100 µl PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ pH 7,2 können fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des flexiPERM® gemacht werden.

2.9 MTT-Test

Um zu zeigen, dass HSA- sowie HSA-WGA-Partikel für Zellen unbedenklich sind, wird ein MTT-Zytotoxizitätstest (EZ4U – Nichtradioaktiver Proliferations- und Zytotoxizitätstest, BioMedica, AT) durchgeführt. MTT (3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) wird dabei aufgrund seiner positiven Ladung von lebenden Zellen aufgenommen. Das Messprinzip beruht auf der Umwandlung des gelbgefärbten Tetrazoliumsalzes in rotgefärbte Formazan-Derivate. Die Zellviabilität ist dabei proportional zur Farbtintensität, da nur lebende Zellen mit intakten Mitochondrien Tetrazoliumsalze reduzieren können [24].

Damit sowohl bei HSA- als auch HSA-WGA-Nanokapseln gleiche Mengen aufgetragen werden, wird der zuvor ermittelte Proteingehalt aus dem BCA-Assay berücksichtigt. Die Partikel werden zunächst auf das jeweilige Zellkultur-Medium (5637: RPMI-1640; SV-HUC-1: F-12K) umgepuffert. Anschließend wird die Proteinmenge auf 1 mg/ml eingestellt und 1:2-, 1:4- sowie 1:8-Verdünnungen bereitet.

Pro Kavität einer 96-Well-Mikrotiterplatte werden 10 000 Zellen in 80 µl des jeweiligen Nährmediums sowie 80 µl HSA- bzw. HSA-WGA-Partikel sowie deren Verdünnungen als Dreifachbestimmung aufgetragen. Die Platte wird anschließend im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂/95 % Luftatmosphäre) inkubiert. Nach einer Inkubation von 3 bis 4 Tagen ist eine Konfluenz von etwa 80 % in den Positivkontrollen (Zellen ohne Partikel) erreicht und der Zellviabilitätstest kann laut Anweisung des Herstellers durchgeführt werden. Dafür wird das Medium abgehoben und durch 200 µl farbloses Medium (RPMI) ersetzt. Danach wird ein Fläschchen mit Substrat in 2,5 ml der Aktivator-Lösung aufgenommen und im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. In jedes Well werden 20 µl dieser Lösung hinzugegeben und durch seitliches Antippen der Mikrotiterplatte vorsichtig vermischt. Zusätzlich wird eine Negativkontrolle aus Medium und MTT-Lösung ohne Zellen angefertigt. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C im Brutschrank für 2 bis 5 Stunden. Nach 2 Stunden wird die Platte bei einer Extinktion von 450 nm (oder 492 nm) und einer Referenz bei 620 nm am TECAN photometrisch gemessen. Danach wird die Mikrotiterplatte weiter im Brutschrank inkubiert und nach jeder weiteren Stunde erneut gemessen [25].

2.10 Freisetzungsstudien von TMP und RIF aus Protein-Partikeln

Neben der Charakterisierung der Einbauraten von TMP und RIF wird auch die Freisetzung des Wirkstoffes aus den Protein-Partikeln überprüft, da diese für eine Wirkung entscheidend ist.

Die verwendeten Akzeptormedien sind in Abschnitt 2.3 beschrieben. Für den 6-stündigen Freisetzungsversuch werden je Partikelcharge und Medium 6 parallele Proben eingesetzt. Bei 150 mM HEPES/NaOH pH 7,4 mit 0,1 % Pronase E wird zusätzlich ein 4-tägiger Freisetzungsversuch durchgeführt, bei dem in 24 Stunden-Intervallen Proben entnommen werden. Dazu werden in einem 5 ml-Eppendorfgefäß 300 µl der Partikelsuspension mit 1 500 µl des Freisetzungsmediums gemischt. Die Gefäße werden auf die Drehscheibe des End-over-End-Rotators (Stuart Rotator SB3, Cole Parmer, UK) gehängt und bei 37 °C und einer Drehzahl von 11 UpM inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation werden von den Proben in 20 mM isotonem HEPES/NaOH pH 7,4 sowie den Proben in 150 mM HEPES/NaOH pH 7,4 mit 0,1 % Pronase E stündlich bzw. täglich 2 x 800 µl entnommen. Die Proben werden in Zentrifugen-Tubes mit speziellem Filter-Einsatz aus einer 0,2 µm PVDF-Membran (Ciro Manufacturing Corporation, FL, USA) aufgeteilt und anschließend zentrifugiert (5 204 x g, 10 min, Raumtemperatur). Aufgrund eines Mangels an Filter-Einsätzen werden die Proben im Akzeptormedium ALF in Centricon-10 Zentrifugen-Filtereinheiten (Amicon Inc., MA, USA) gefüllt und zentrifugiert (3 000 UpM, 1 h,

28

Raumtemperatur). Durch das Zentrifugieren werden intakte Partikel sowie Proteinreste vom gelösten Wirkstoff abgetrennt. Die nun im Akzeptorraum vorliegende Lösung enthält den freien Wirkstoff, von der jeweils 900 µl entnommen und anschließend lyophilisiert werden.

Die gefriergetrockneten Proben werden in 150 µl kaltem MeOH aufgenommen, um die vorherige 1:6-Verdünnung der Partikel aufzuheben. Danach wird der TMP- bzw. RIF-Gehalt, wie in der, in Abschnitt 2.6.2 beschriebenen, HPLC-Methode, quantifiziert.

2.11 Wirksamkeit der TMP- und RIF-Nanokapseln

2.11.1 Nachweis mittels Agardiffusionstests

Um den antibiotischen Effekt der Wirkstoff-haltigen Nanokapseln zu bestimmen, werden Agardiffusionstests durchgeführt, wobei nach den EUCAST-Richtlinien gearbeitet wird [26].

Die für den Versuch verwendeten Petrischalen mit Müller-Hinton-Agar als Nährboden sowie die *E. coli*- und *Staph. ssp.*-Suspensionen wurden dankenswerterweise von ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Studenik zur Verfügung gestellt.

2.11.1.1 Probenvorbereitung

Die zu überprüfenden Partikelsuspensionen werden auf einen Wirkstoff-Gehalt von 0,5 mg/ml eingestellt. Als Positivkontrolle werden 0,5 mg/ml TMP- bzw. RIF-Lösungen in Pluronic® 1 % (m/v) angefertigt, indem der Wirkstoff zunächst in Isopropanol gelöst und nach Zugabe von Pluronic® 1 % (m/v) das Isopropanol wieder vollständig abgedampft wird. Als Negativkontrolle werden HSA- bzw. HSA-WGA-Partikel verwendet. Diese werden auf eine Proteinkonzentration von etwa 0,75 mg/ml eingestellt, was dem durchschnittlichen Proteingehalt der verwendeten Wirkstoff-Nanokapseln entspricht, um auch hier eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

2.11.1.2 Versuchsaufbau

Zunächst muss je Bakterienart eine standardisierte Keimsuspension bereit werden. Dazu wird mithilfe eines McFarland-Densitometers (Grant Instruments™ Grant Bio™ DEN-1, UK) die Trübung der Bakteriensuspension gemessen. Anschließend wird diese mit steriler 0,9 % NaCl-Lösung auf einen McFarland von 0,5 eingestellt, was einer Bakterienkonzentration von $1,5 \times 10^8$ KBE/ml entspricht (vgl. Abbildung 5).

McFarland Standard	Bacterial concentration, $\times 10^8 \text{ ml}^{-1}$	Theoretical optical density, 550 nm
0.5	1.5	0.125
1.0	3.0	0.250
2.0	6.0	0.500
3.0	9.0	0.750
4.0	12.0	1.000
5.0	15.0	1.250
6.0	18.0	1.500
7.0	21.0	1.750

Abbildung 5: McFarland-Skala zur Berechnung der Bakterienkonzentration [27].

Die eingestellte Keimsuspension wird nun mithilfe eines Plattenrotators (Liofilchem® S.r.l., IT) aufgetragen. Ein steriler Wattetupfer wird in die Suspension getaucht und die Agarplatte durch zweimaliges Ausstreichen von der Mitte zum Rand und wieder zurück beimpft.

Nachdem der Nährboden vollständig mit der Bakteriensuspension benetzt worden ist, können die zuvor bereiteten Proben aufgetragen werden. Dazu werden 10 µl der 0,5 mg/ml konzentrierten Partikel direkt auf die Agarplatte aufgebracht. Somit wird eine Wirkstoff-Konzentration von 5 µg eingesetzt. Diese Menge entspricht der EUCAST-Richtlinie für TMP- und RIF-Disks [28]. Für das Aufbringen der Wirkstoff-Lösungen werden UV-sterilisierte Filterpapierscheiben mit einem Durchmesser von 5 mm mit 10 µl der Lösungen präpariert. Diese werden anschließend auf die Agarplatten gelegt und mit einer sterilen Pinzette leicht angedrückt.

Danach werden die Agarplatten in einem Inkubator bei 36 °C für 16-20 Stunden inkubiert.

2.11.1.3 Auswertung

Die Auswertung der Antibiogramme erfolgt, indem die Agarplatten optisch auf Hemmhöfe (klare Zonen rund um die Proben) untersucht werden. Außerdem wird deren Durchmesser mittels Schublehre ermittelt.

2.11.2 Nachweis mittels Minimaler Hemmkonzentration (MHK)

Eine weitere Methode, um die Wirksamkeit der hergestellten Antibiotika-Nanokapseln zu testen, ist die Überprüfung der Minimalen Hemmkonzentration.

2.11.2.1 Erstellen einer Kalibriergeraden für Bakterien

Zunächst wird die Stamm-Keimsuspension mit Nährbouillon gemischt und über Nacht im Inkubator bei 30 °C gelagert. Sobald ein McFarland von 8 erreicht wird, können aus dieser Keimsuspension 1:2-Verdünnungen mit Nährbouillon bereitete werden. Die Verdünnungsstufen

werden anschließend als Dreifachbestimmung am TECAN bei 600 nm photometrisch gemessen.

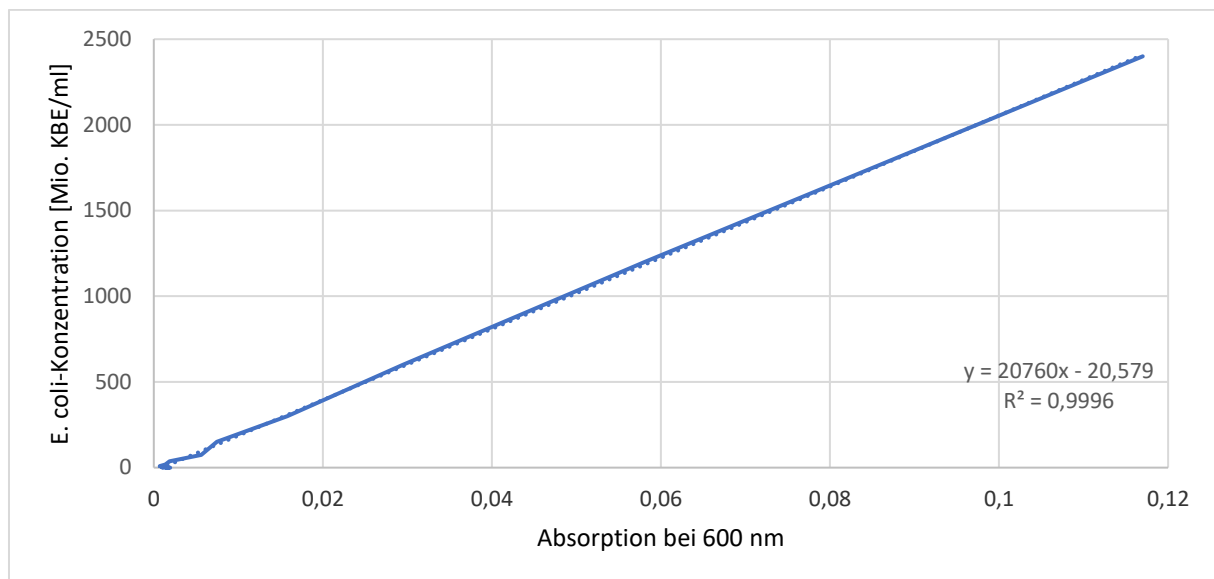


Abbildung 6: Kalibriergerade für E. coli in Nährbouillon bei 600 nm.

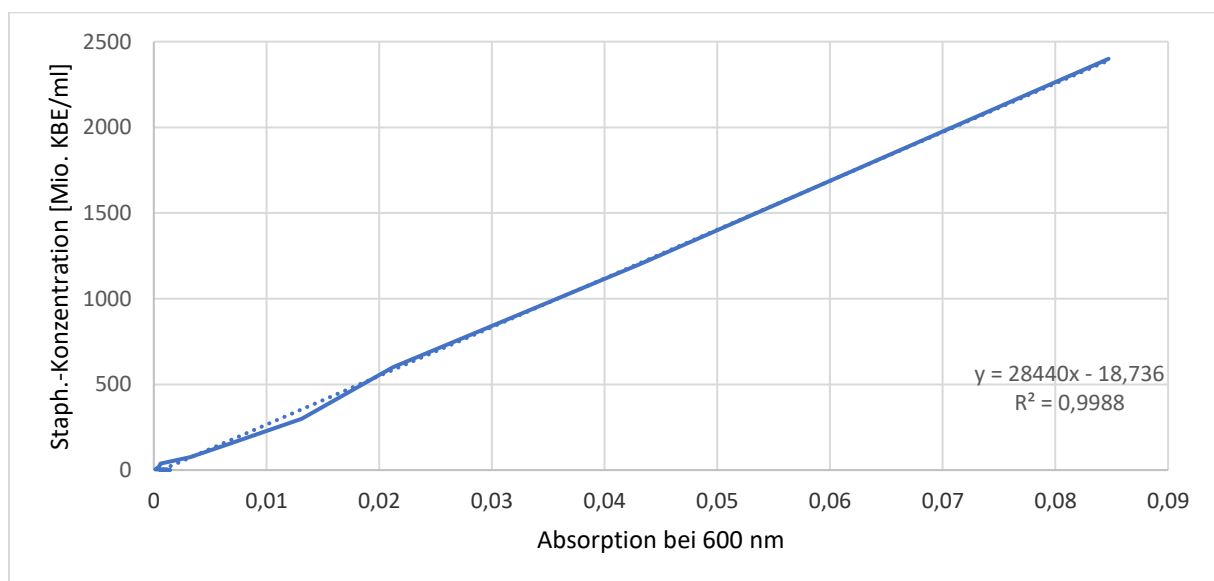


Abbildung 7: Kalibriergerade für Staph. ssp. in Nährbouillon bei 600 nm.

2.11.2.2 Versuchsaufbau

Zuerst werden die zu testenden Antibiotika-Nanokapseln auf eine Wirkstoff-Konzentration von 200 µg/ml eingestellt. Die Keimsuspensionen werden wie in Abschnitt 2.11.1.2 beschrieben auf 0,5 McFarland eingestellt. Danach folgt eine weitere Verdünnung mit Nährbouillon auf etwa 30 000 KBE/ml. In einer Epruvette werden 4,5 ml dieser Bakteriensuspension vorgelegt und 500 µl der Partikelsuspension hinzugegeben. Es liegt nun eine finale Wirkstoff-Konzentration

von 20 µg/ml vor. In neun weiteren Eprouvetten werden 2,5 ml der Bakteriensuspension vorgelegt und jeweils mit 2,5 ml der vorigen Verdünnung gemischt.

Nach Erstellung der geometrischen Verdünnungsreihe wird aus jeder Eprouvete eine Stichprobe gezogen und der Ausgangswert als Dreifachbestimmung am TECAN bei einer Absorption von 600 nm ermittelt.

Die Eprouvetten werden anschließend im Inkubator bei 30 °C für 14-22 Stunden inkubiert.

2.11.2.3 Auswertung

Nach erfolgter Inkubation werden die Proben homogenisiert und erneut Stichproben entnommen, um am TECAN die Absorption zu bestimmen. Die Differenz der Absorption nach der Inkubation und dem Ausgangswert kann in die zuvor erstellte Kalibriergerade eingesetzt werden. Somit kann auf ein Bakterien-Wachstum in KBE/ml rückgeschlossen werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Herstellung der Protein-Partikel inkl. Optimierung des Wirkstoff-Einbaus

Zur Herstellung der HSA- und HSA-WGA-Nanokapseln wurde ein bereits optimiertes Protokoll, das in der Arbeitsgruppe entwickelt wurde [10], ohne weitere Änderungen übernommen.

Da aber erstmals versucht wurde, statt des Modellwirkstoffs BodiPyTM einen tatsächlichen Wirkstoff einzubauen, musste das vorhandene Protokoll weiterentwickelt werden. Dabei wurden unterschiedliche Herstellungsmethoden verwendet. Wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, wurden die Wirkstoffe jeweils in den Ölkern eingebaut oder an das Protein der Kapsel-Hülle gebunden.

Als Wirkstoffe wurden zwei Antibiotika mit unterschiedlichen Eigenschaften gewählt. Einerseits Trimethoprim (TMP) mit einer niedrigeren Lipophilie ($\log P = 0,91$) und andererseits Rifampicin (RIF) mit einer höheren Lipophilie ($\log P = 2,7$) [29, 30]. Auch hinsichtlich der Plasmaproteinbindung (PPB) gibt es große Unterschiede. Während TMP eine PPB von nur 40-50 % [31] aufweist, beträgt die PPB von RIF 75-80 % [32].

Es soll untersucht werden, inwieweit die Lipophilie des Wirkstoffes die Effizienz des Einbaus in den Kern beeinflusst. Außerdem soll geklärt werden, ob aufgrund der PPB der Wirkstoffe auch eine „Beladung“ des Proteins der Hülle möglich ist und inwieweit die PPB dabei zu Unterschieden führt.

Des Weiteren wurden Nanokapseln hergestellt, bei denen sowohl RIF in den Kern eingebaut als auch TMP an HSA gebunden wurde. Diese kombinierten Partikel sollen zeigen, ob die Protein-Nanokapseln eine Kombinationstherapie ermöglichen könnten.

Da sich RIF bei der Partikelherstellung trotz seiner hohen Lipophilie im Kaliumphosphat-Puffer pH 8 gut löste, wurden auch Partikel mit einem Kaliumphosphat-Puffer pH 5,44 hergestellt. Grund dafür ist, dass RIF im sauren Puffer ($\text{pH} < 6$) schlecht bis gar nicht löslich ist. Folglich soll untersucht werden, ob mit dem anderen Herstellungspuffer eine gezielte Verkapselung des Wirkstoffes möglich ist und inwieweit sich dieser auf den Einbau bzw. die Beladung von RIF auswirkt. Wider Erwarten wurden dabei größere Partikel hergestellt, die nachfolgend als Mikrokapseln bezeichnet werden.

3.2 Charakterisierung der Protein-Partikel

Nach der Herstellung der Protein-Partikel wurden alle Chargen hinsichtlich Partikelgröße, PDI und Zetapotential sowie auf ihren Proteingehalt charakterisiert. Bei Wirkstoff-haltigen Protein-Partikeln wurde zusätzlich der Wirkstoff-Gehalt quantifiziert.

3.2.1 Partikelgröße und PDI

Zur Bestimmung der Partikelgröße und des PDI wurde jede Nanokapsel-Charge mit dem Zetasizer Nano ZS gemessen. Die RIF-Mikrokapseln hingegen waren mit über 1 000 nm für eine genaue Messung zu groß, weswegen die Größenbestimmung mit dem Mastersizer 3000 erfolgte. Hierbei wurde als durchschnittliche Partikelgröße ein Mittelwert von D[4;3] aus 5 Einzelmessungen herangezogen. Tabelle 1 fasst die Messdaten mehrerer Partikelchargen zusammen, wobei n die Anzahl der Einzelmessungen angibt.

	durchschnittliche Partikelgröße	PDI
HSA-Nanokapseln n = 27	848,91 ± 55,29 nm	0,15 ± 0,10
HSA-WGA-Nanokapseln n = 18	835,75 ± 53,02 nm	0,18 ± 0,09
TMP(x;O)-Nanokapseln n = 6	866,27 ± 22,79 nm	0,16 ± 0,09
TMP(x;P)-Nanokapseln n = 15	774,17 ± 74,37 nm	0,17 ± 0,07
RIF(x;O)-Nanokapseln n = 15	726,15 ± 63,31 nm	0,24 ± 0,11
RIF(x;P)-Nanokapseln n = 3	735,77 ± 4,87 nm	0,27 ± 0,02
TMP(x;P)-RIF(x;O)-Nanokapseln n = 3	694,30 ± 2,86 nm	0,24 ± 0,04
RIF(x;O)-Mikrokapseln n = 5	5,48 ± 0,06 µm	-
RIF(x;P)-Mikrokapseln n = 5	2,93 ± 0,03 µm	-

Tabelle 1: Übersicht der Partikelgröße und des PDI verschiedener Nano- und Mikrokapseln.

In der Tabelle ist ersichtlich, dass die Partikelgröße und der PDI der Nanokapseln – unabhängig von der Art der Proteinhülle sowie dem Einbau bzw. der Beladung mit Wirkstoffen – weitestgehend unverändert bleiben. Der Größenunterschied zwischen HSA-Partikeln (848,91 ± 55,29 nm) und HSA-WGA-Partikeln (835,75 ± 53,02 nm) ist statistisch nicht signifikant. Auch bei TMP-haltigen Nanokapseln ist mit keiner Änderung der Partikelgröße zu rechnen. RIF-Nanokapseln hingegen waren mit einer Größe von 726,15 ± 63,31 nm bzw. 735,77 ± 4,87 nm marginal kleiner. Bei Nanokapseln mit beiden Wirkstoffen wurde lediglich eine Größe von 694,30 ± 2,86 nm erreicht.

Durch pH-Änderung des Herstellungspuffers auf pH 5,44 konnten Mikrokapseln hergestellt werden. Deren Größe variierte zwischen $2,93 \pm 0,03 \mu\text{m}$ und $5,48 \pm 0,08 \mu\text{m}$, abhängig davon, ob RIF im Öl eingebaut wurde oder an das Hüllprotein gebunden vorliegt.

Für die hergestellten Nanokapseln wurde ein $\text{PDI} \leq 0,2$ als monodispers definiert [17]. Der mittlere PDI beträgt bei HSA-Partikeln $0,15 \pm 0,10$ und bei HSA-WGA-Partikeln $0,18 \pm 0,09$, womit die Vorgabe von $\text{PDI} \leq 0,2$ erfüllt wurde. Auch bei TMP-haltigen Nanokapseln konnte der gewünschte PDI erreicht werden. Lediglich bei Nanokapseln, welche RIF enthalten, fällt die Größenverteilung mit einem PDI zwischen $0,24 \pm 0,04/0,11$ und $0,27 \pm 0,02$ etwas breiter aus.

3.2.2 Zetapotential

Mit Hilfe des Zetapotentials, welches durch den Zetasizer Nano ZS ermittelt wurde, kann eine zuverlässige Aussage über die Stabilität der Partikel getroffen werden. Ursächlich dafür ist die bestimmte Oberflächenladung, die in einem Medium dispergierte Partikel besitzen. Je größer positiv oder negativ diese Ladung ist, desto stärker wird die Agglomeration verhindert, da sich die Partikel gegenseitig abstoßen. Dabei gelten Dispersionen mit einem Zetapotential von etwa $\pm 30 \text{ mV}$ als stabil [17].

Wie Tabelle 2 zeigt, wurde bei den HSA- sowie den HSA-WGA-Nanokapseln annähernd ein Zetapotential von -30 mV erreicht, womit eine ausreichende Stabilität in Suspension gewährleistet war. Ähnlich wie bei Größe und PDI stechen auch hier die etwas abweichenden Messergebnisse der RIF-Nanokapseln hervor. RIF(x;O)-Nanopartikel lagen mit $-25,43 \pm 2,44 \text{ mV}$ noch im Rahmen der anderen Messwerte, RIF(x;P)-Nanokapseln hatten dabei schon ein signifikant niedrigeres Zetapotential ($-22,80 \pm 1,61 \text{ mV}$).

Da bei Mikrokapseln auch der Ölkern größer ist, führt dies aufgrund des Dichteunterschieds zwischen Olivenöl und dem Lagerungspuffer Pluronic® 1 % (m/v) zu einem wesentlich schnelleren Aufrahmen der Partikel. Dies war auch optisch erkennbar, da es während der Lagerung der Mikrokapseln bereits innerhalb weniger Stunden zu einer Phasentrennung kam. Um dies zu bestätigen, wurde das Zetapotential auch bei Mikrokapseln bestimmt. Wie erwartet, fiel das Zetapotential mit $-16,17 \pm 2,51 \text{ mV}$ bei RIF(x;O)-Mikrokapseln bzw. $-2,95 \pm 0,41 \text{ mV}$ bei RIF(x;P)-Mikrokapseln niedrig aus. Die Mikropartikel waren zwar redispergierbar, jedoch müssten Größenuntersuchungen über mehrere Tage durchgeführt werden, um abschließende Erkenntnisse über die Stabilität zu gewinnen.

	Zetapotential [mV]
HSA-Nanokapseln n = 9	-28,86 ± 1,15
HSA-WGA-Nanokapseln n = 9	-27,44 ± 2,68
TMP(x;O)-Nanokapseln n = 3	-28,30 ± 0,56
TMP(x;P)-Nanokapseln n = 9	-26,12 ± 2,56
RIF(x;O)-Nanokapseln n = 12	-25,43 ± 2,44
RIF(x;P)-Nanokapseln n = 3	-22,80 ± 1,61
TMP(x;P)-RIF(x;O)-Nanokapseln n = 3	-23,4 ± 0,92
RIF(x;O)-Mikrokapseln n = 3	-16,17 ± 2,51
RIF(x;P)-Mikrokapseln n = 3	-2,95 ± 0,41

Tabelle 2: Übersicht der Zetapotentiale verschiedener Nano- und Mikrokapseln.

3.2.3 Morphologie

Die hergestellten Protein-Nanokapseln wurden hinsichtlich ihrer Morphologie mittels Kryoelektronenmikroskopie analysiert (Abbildung 8). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass die Nanokapseln eine relativ glatte Oberflächenbeschaffenheit aufweisen.

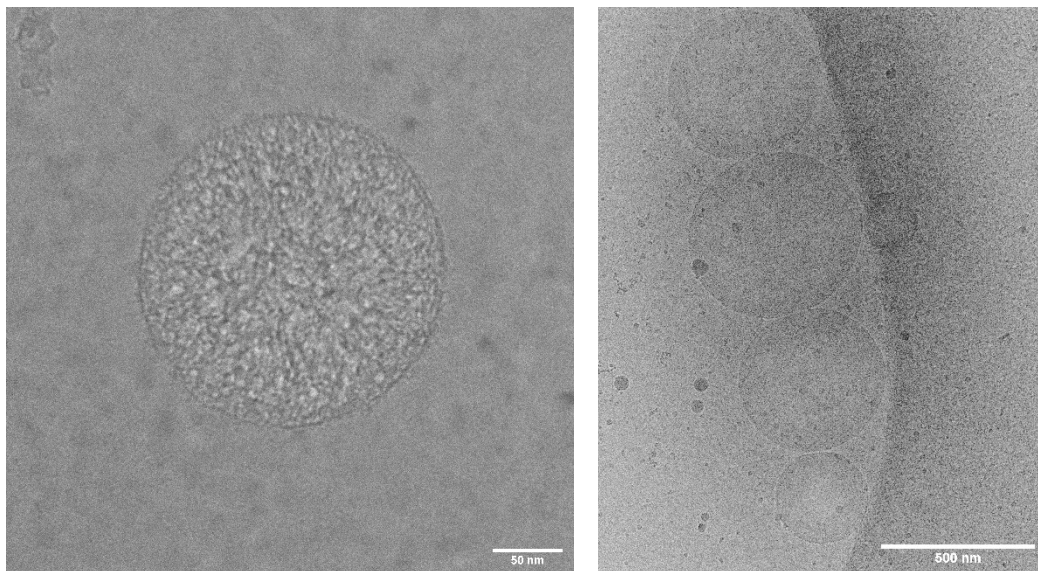


Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Protein-Nanokapseln.

3.2.4 Proteingehalt

Der in Abschnitt 2.5.4 beschriebene BCA-Protein-Assay wurde zur Quantifizierung des Gehaltes an Hüllprotein der Nanokapseln durchgeführt. Dabei wurde von den jeweiligen

Messergebnissen ein gleich mitbehandelter Leerwert aus Pluronic® 1 % (m/v) abgezogen. Bei den Wirkstoff-haltigen Nanopartikeln führte das enthaltene Rifampicin, das mit einem Bestandteil des BCA-Kits reagierte, zu einer verstärkten violetten Färbung. Deswegen wurde sowohl bei TMP- als auch RIF-haltigen Partikeln als Leerwert eine Wirkstoff-Lösung in Pluronic® 1 % (m/v), welche dem mittels HPLC gemessenen Wirkstoff-Gehalt entspricht, abgezogen.

In Tabelle 3 sind die Proteinkonzentrationen von HSA- und HSA-WGA-Nanokapseln dargestellt. Aufgrund der erstellten Eichgerade zur HSA-Quantifizierung und der Tatsache, dass sich eine Kombination aus verschiedenen Proteinen in einem Protein-Assay nicht oder nur schwer differenzieren lässt, bezieht sich der ermittelte Proteingehalt nur auf den HSA-Anteil. Es ist zu erkennen, dass bei Nanokapseln mit WGA als Bestandteil der Kapselhülle etwa ein Drittel weniger Protein detektiert wurde. Dies entspricht dem eingesetzten molaren Verhältnis der Hüllkomponenten von 1 Teil WGA und 2 Teilen HSA. Die Messungen ergaben vergleichsweise hohe Standardabweichungen, die vermutlich auf biologische Schwankungen des HSA zurückzuführen sind. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass das Protein aufgrund seiner Hygroskopizität während der Lagerung Wasser gezogen hat, wodurch die Einwaage variierte. Die Proteinkonzentrationen der Nanokapseln wurden jedoch durch den Wirkstoff-Einbau nicht verändert und befanden sich in der gleichen Größenordnung.

	Proteinkonzentration [mg/ml]
HSA-Nanokapseln n = 6	0,80 ± 0,32
HSA-WGA-Nanokapseln n = 4	0,52 ± 0,14

Tabelle 3: Übersicht der Proteinkonzentrationen von HSA- und HSA-WGA-Nanokapseln.

3.2.5 Loading Capacity und Encapsulation Efficiency von TMP- und RIF-Proteinpartikeln

Zur Charakterisierung der Wirkstoff-haltigen Proteinpartikel wurde jeweils die LC und EE ermittelt. Dafür wurden die Wirkstoffkonzentrationen der HPLC-Quantifizierung sowie die Proteingehälter des BCA-Assays herangezogen. Die Einbau- bzw. Beladungskapazität (LC [%]) gibt den Anteil an Wirkstoff in einem Partikel an. Die EE [%] gibt die Einbau- bzw. Beladungsrate wieder, also wie viel des eingesetzten Wirkstoffes tatsächlich eingebaut werden konnte.

In Tabelle 4 sind die LC und EE von TMP-haltigen Nanokapseln – mit TMP in den Ölkern eingebaut bzw. am Hüllprotein gebunden – gezeigt. Daraus kann entnommen werden, dass unabhängig von der eingesetzten TMP-Menge, nur ein sehr ineffizienter Einbau in das Öl

erfolgt. Wird TMP jedoch an HSA gebunden, kann die LC und EE von $0,44 \pm 0,02$ % bzw. $0,87 \pm 0,04$ % auf $5,03 \pm 0,18$ % bzw. $10,30 \pm 0,38$ % (bei 10 mg TMP) gesteigert werden. Dies entspricht einer Steigerung der LC um mehr als das 11-fache, womit es bei einem weniger lipophilen Wirkstoff wie TMP wesentlich effizienter ist, die Proteinhülle mit Wirkstoff zu beladen. Eine Erhöhung der eingesetzten TMP-Menge, welche an das Hüllprotein gebunden werden soll, geht nicht mit einer gesteigerten Beladung einher, da der Wirkstoff aufgrund seiner limitierten Löslichkeit während der Herstellung ausfällt.

TMP-Nanokapseln	LC [%]	EE [%]
TMP(2,5;O)-Nanokapseln	$0,38 \pm 0,00$	$2,90 \pm 0,01$
TMP(5;O)-Nanokapseln	$0,57 \pm 0,05$	$2,23 \pm 0,20$
TMP(10;O)-Nanokapseln	$0,44 \pm 0,02$	$0,87 \pm 0,04$
TMP(20;O)-Nanokapseln	$0,77 \pm 0,04$	$0,76 \pm 0,04$
TMP(10;P)-Nanokapseln	$5,03 \pm 0,18$	$10,30 \pm 0,38$
TMP(20;P)-Nanokapseln	$1,26 \pm 0,04$	$1,28 \pm 0,04$

Tabelle 4: Vergleich der LC [%] und EE [%] von TMP-Nanokapseln (n = 3).

In Tabelle 5 sind die – im Vergleich zu TMP-Nanokapseln – deutlich gesteigerten LC und EE von RIF-Nanokapseln gezeigt. Durch die höhere Lipophilie von RIF konnte deutlich mehr Wirkstoff in den Ölkern eingebaut werden. Bei 10 mg eingesetztem Wirkstoff konnte bei Nanopartikeln mit RIF in der Kapselhülle mehr eingebaut werden ($7,14 \pm 0,10$ % LC; $14,61 \pm 0,21$ % EE) als bei Nanokapseln mit RIF im Kern ($4,60 \pm 0,36$ % LC; $9,41 \pm 0,75$ % EE).

RIF-Nanokapseln	LC [%]	EE [%]
RIF(2,5;O)-Nanokapseln	$0,97 \pm 0,01$	$8,12 \pm 0,07$
RIF(5;O)-Nanokapseln	$1,53 \pm 0,02$	$6,14 \pm 0,09$
RIF(10;O)-Nanokapseln	$4,60 \pm 0,36$	$9,41 \pm 0,75$
RIF(20;O)-Nanokapseln	$12,70 \pm 0,62$	$12,87 \pm 0,63$
RIF(10;P)-Nanokapseln	$7,14 \pm 0,10$	$14,61 \pm 0,21$
RIF(20;P)-Nanokapseln	-	-

Tabelle 5: Vergleich der LC [%] und EE [%] von RIF-Nanokapseln (n = 3).

In der Abbildung 9 wird die LC der TMP- und RIF-Nanokapseln als Diagramm veranschaulicht. Beim RIF-Einbau in den Ölkern ist zu sehen, dass die LC mit zunehmender Menge an eingesetztem RIF kontinuierlich steigt, wohingegen die LC von TMP-Nanokapseln generell auf

einem niedrigen Niveau bleiben. Der direkte Vergleich von TMP- und RIF-Nanokapseln mit 10 mg eingesetztem Wirkstoff ergibt folgendes: Das deutlich lipophilere RIF ($\log P = 2,7$) [30] kann um mehr als das 10-fache effizienter in den Ölkern eingebaut werden als TMP ($\log P = 0,9$) [29]. Bei der Wirkstoff-Beladung an das Hüllprotein wird RIF aufgrund der höheren Plasmaproteinbindung um 1,42-fach besser gebunden als TMP. Somit macht der $\log P$ einen größeren Unterschied hinsichtlich des Einbaus als verschieden hohe Plasmaproteinbindungen.

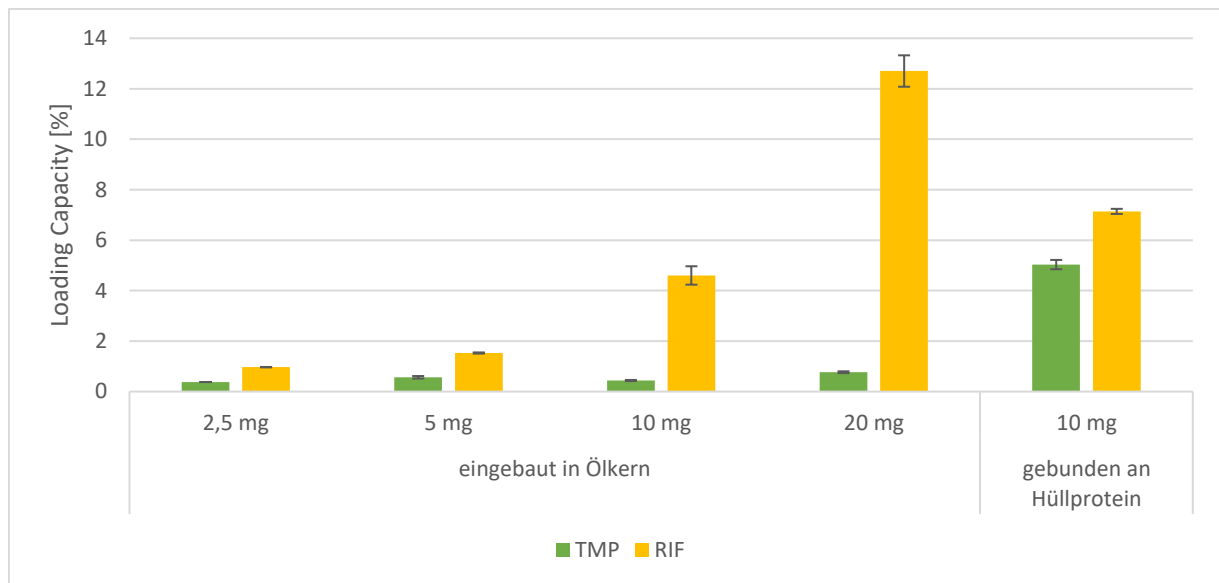


Abbildung 9: Vergleich der LC [%] von TMP- und RIF-Nanokapseln.

Tabelle 6 zeigt die LC und EE von kombinierten Nanopartikeln mit TMP und RIF. Dabei ist zu erkennen, dass die einzelnen Werte mit ungefähr 5 % LC und 10 % EE in etwa so hoch sind wie bei den TMP- bzw. RIF-Nanokapseln mit der gleichen Menge an eingesetztem Wirkstoff. Durch die Kombination der Wirkstoffe in einer Nanokapsel kann somit der Gesamtwirkstoff-Gehalt mehr als verdoppelt werden, da beide Wirkkomponenten gleich effizient eingebaut werden wie einzeln. Dies ist auch hinsichtlich einer Kombinationstherapie z.B. bei Harnwegsinfektionen interessant, da dadurch verschiedene Wirkstoffe mit unterschiedlichen Wirkmechanismen bzw. Wirkspektren zum Einsatz kommen können.

TMP-RIF-Nanokapseln	LC [%]	EE [%]
TMP(10;P)	5,98 ± 0,30	12,31 ± 0,62
RIF(10;O)	5,53 ± 0,30	11,27 ± 0,61

Tabelle 6: Übersicht der LC [%] und EE [%] von TMP-RIF-Nanokapseln (n = 3).

In Tabelle 7 wird gezeigt, dass bei den hergestellten Mikro kapseln mit RIF deutlich weniger Wirkstoff eingebaut wurde als bei den entsprechenden RIF-Nanokapseln (Tabelle 5). Durch den sauren Herstellungspuffer mit pH 5,44 sollte beim RIF-Einbau in den Ölkern theoretisch mehr eingebaut werden, da das Auswaschen des Wirkstoffes aus den Partikeln reduziert wird. Durch pH-Änderung des Puffers wurden jedoch größere Partikel hergestellt, wodurch der Wirkstoff-Einbau nicht mit dem der Nanokapseln vergleichbar ist. Wird RIF an das Hüllprotein der Mikro kapseln gebunden, wird bei der Herstellung mit dem sauren Puffer wie erwartet, deutlich weniger Wirkstoff eingebaut. Dadurch, dass der Wirkstoff bei pH < 6 kaum in Lösung vorliegt, konnte demnach trotz seiner hohen Plasmaproteinbindung kein effizienter Einbau gelingen.

RIF-Mikro kapseln	LC [%]	EE [%]
RIF(10;O)-Mikro kapseln	1,23 ± 0,01	2,40 ± 0,02
RIF(10;P)-Mikro kapseln	0,68 ± 0,03	1,36 ± 0,05

Tabelle 7: Übersicht der LC [%] und EE [%] von RIF-Mikro kapseln (n = 3).

3.3 Bindungsstudien an unterschiedlichen Zellmodellen

Um die Bindungsaffinität von Nanokapseln mit dem Targeter-Molekül WGA im Vergleich zu Partikeln ohne Targeter zu überprüfen, wurden verschiedene Arten von Zellversuchen durchgeführt. Die Partikel-Adhäsion wurde dabei sowohl an Tumor- (5637) als auch an gesunden Urothelzellen (SV-HUC-1) getestet. Dadurch soll eine mögliche Anwendung der HSA-WGA-Nanokapseln als Drug Delivery System bei Blasentumoren aber auch bei Harnwegsinfektionen untersucht werden.

Für die Bindungsstudien wurden fluoreszenzmarkierte HSA- und HSA-WGA-Nanokapseln verwendet. Beide Partikelchargen wurden für die Vergleichbarkeit auf gleiche Fluoreszenz, die 1,31 µg/ml BodiPy™ entspricht, eingestellt und einige Verdünnungsstufen bereitet. Die Inkubation der Zellen mit den Partikeln beträgt 1 Stunde bei 4 °C. Die Bindungsaffinität an Einzelzellen wurde danach durchflusszytometrisch bestimmt. Um die Bindung auch an Zellverbänden zu untersuchen, standen zwei Möglichkeiten zur Verfügung: klassische Monolayer-Studien und ein speziell angefertigter Cellcube.

3.3.1 Bindungsstudien an Einzelzellen mittels Durchflusszytometer

In Abbildung 10 ist die relative zell-assoziierte Fluoreszenzintensität (RFI) von HSA- bzw. HSA-WGA-Nanokapseln an 5637-Zellen dargestellt. Bei unverdünnten HSA-Partikeln konnte eine RFI von 5,09 ± 0,15 (1,31 µg/ml BodiPy™) erreicht werden. Mit zunehmender Verdünnung

sank die RFI kontinuierlich auf $3,77 \pm 0,17$ bei ($0,66 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM), $2,47 \pm 0,08$ ($0,33 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM) bzw. $1,42 \pm 0,05$ ($0,16 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM). Bei unverdünnten HSA-WGA-Partikeln konnte jedoch mit einer maximalen RFI von $6,96 \pm 0,17$ ($1,31 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM) eine um 1,37-fach bessere Bindung erzielt werden. Auch hier sank die RFI mit zunehmender Verdünnung auf $4,95 \pm 0,01$ ($0,66 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM), $3,23 \pm 0,17$ bei ($0,33 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM) bzw. $1,72 \pm 0,04$ ($0,16 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM). Somit konnten selbst bei Konzentrationen von $0,66 \mu\text{g/ml}$ bzw. $0,33 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM eine um 1,31- bzw. 1,30-fach bessere Adhäsion von HSA-WGA-Nanokapseln an die Zellen erreicht werden.

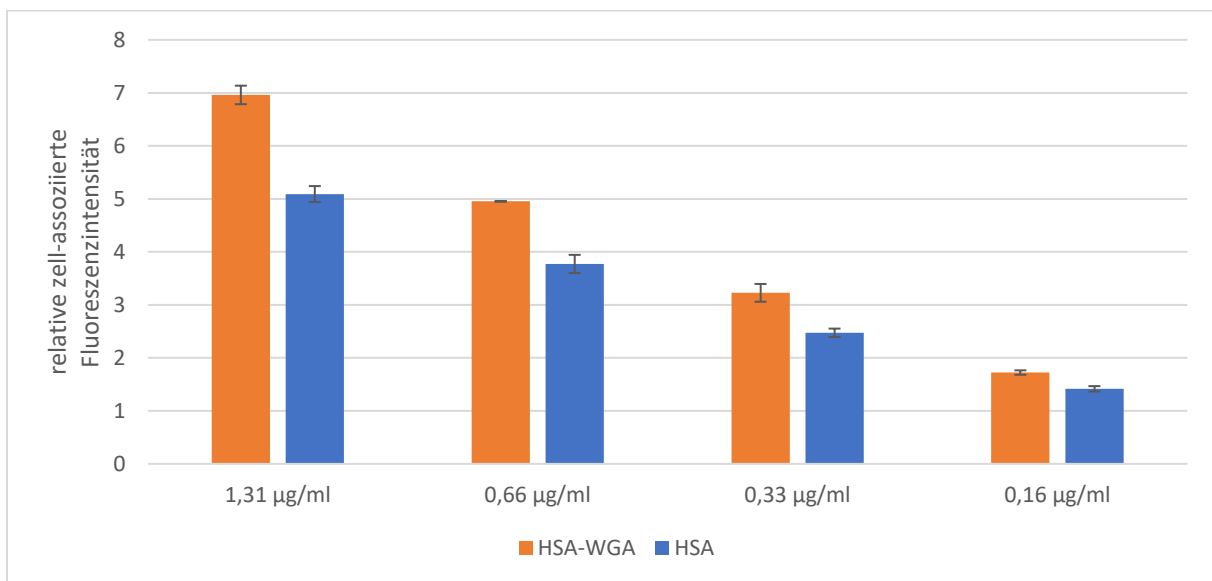


Abbildung 10: Bindungsstudie mittels Durchflusszytometer an 5637-Einzelzellen.

Eine analog durchgeführte Bindungsstudie an SV-HUC-1-Zellen (Abbildung 11) lieferte vergleichbare Ergebnisse. Bei unverdünnten HSA-Partikeln konnte eine zellgebundene Fluoreszenz von $3,01 \pm 0,08$ detektiert werden. Die weiteren Partikel-Verdünnungen ergaben $2,07 \pm 0,02$ bei einer Konzentration von $0,66 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM, $1,33 \pm 0,03$ ($0,33 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM) bzw. $0,71 \pm 0,03$ bei der geringsten Verdünnung von $0,16 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM. Unverdünnte Partikel mit WGA zeigten in diesem Fall eine maximale RFI von $3,97 \pm 0,14$ ($1,31 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM). Die jeweiligen Verdünnungen ergaben RFI-Werte von $2,82 \pm 0,05$ ($0,66 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM), $1,65 \pm 0,06$ ($0,33 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM) bzw. $0,99 \pm 0,06$ ($0,16 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM).

Somit ist die RFI bei unverdünnten HSA-WGA-Partikeln um den Faktor 1,32 höher, jedoch konnte selbst bei einer 1:8-Verdünnung ($0,16 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM) der Partikel eine um 1,40-fach bessere Bindung erzielt werden. Unabhängig von der Verdünnung zeigten die HSA-WGA-Partikel eine bessere Adhäsion an die Zellen um durchschnittlich 32,9 %.

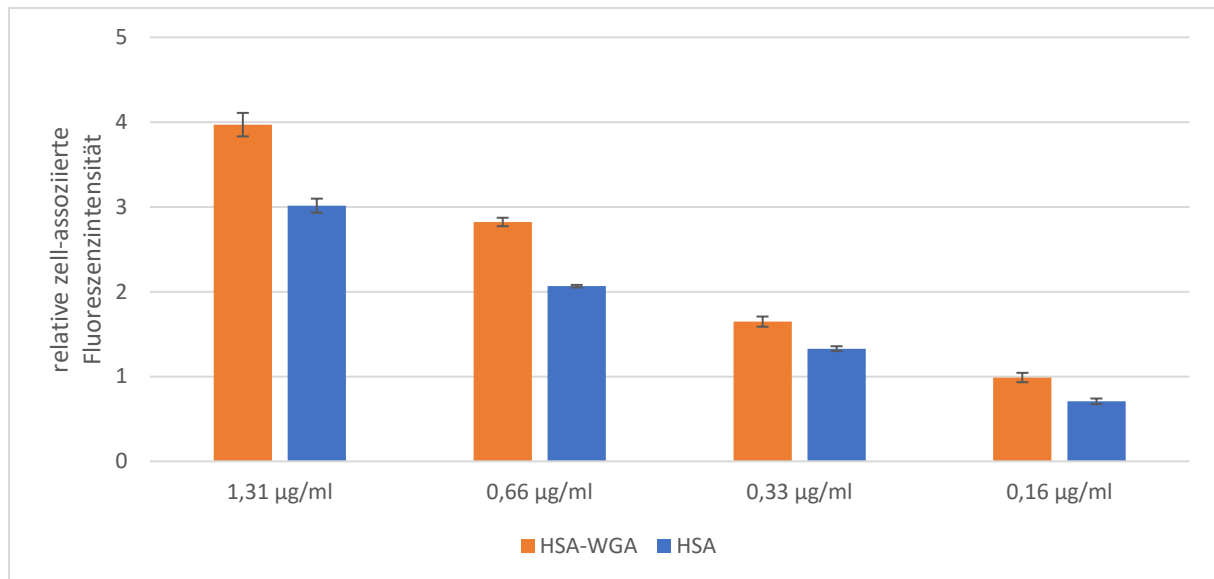


Abbildung 11: Bindungsstudie mittels Durchflusszytometer an SV-HUC-1-Einzelzellen.

3.3.2 Bindungsstudien an Monolayern

Um den Targeting-Effekt der HSA-WGA-Nanokapseln nicht nur an Einzelzellen zu zeigen, wurden mit den gleichen Verdünnungen auch Monolayer-Versuche durchgeführt. Die Daten in Abbildung 12 zeigen, dass auch bei 5637-Monolayern Partikel mit WGA eine bessere Bindung als Partikel ohne WGA erzielten. Unverdünnte HSA-Partikel ergaben eine RFI von $2,00 \pm 0,39$ % ($1,31 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM). Mit zunehmender Partikel-Verdünnung stieg die RFI auf $4,89 \pm 0,27$ % ($0,66 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM), $9,42 \pm 0,48$ % ($0,33 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM) bzw. $16,48 \pm 0,96$ % ($0,16 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM). Nanokapseln mit WGA hingegen erreichten bei einer BodiPyTM-Konzentration von $1,31 \mu\text{g/ml}$ eine RFI von $2,44 \pm 0,01$ %. Bei der geringsten Verdünnung von $0,66 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM stieg die RFI auf $6,65 \pm 0,18$ % und bei $0,33 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM auf $12,42 \pm 0,74$ %. Die maximale RFI konnte bei $0,16 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM mit $18,44 \pm 0,70$ % detektiert werden. Der größte Unterschied zwischen HSA- und HSA-WGA-Partikeln wurde demnach bei Konzentrationen von $0,66 \mu\text{g/ml}$ bzw. $0,33 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM mit einer um 1,36- bzw. 1,32-fach besseren zellulären Adhäsion der Nanokapseln mit WGA festgestellt.

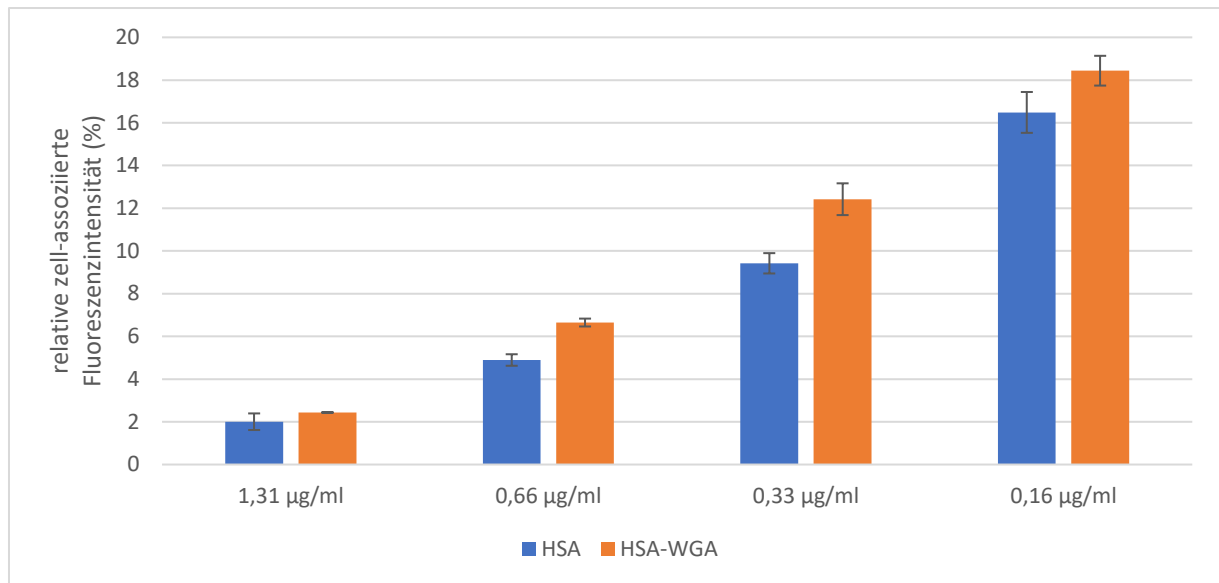


Abbildung 12: Bindungsstudien an Monolayern mit 5637-Zellen.

Die Ergebnisse des Monolayer-Versuches mit SV-HUC-1-Zellen sind in Abbildung 13 dargestellt. Dabei konnten unverdünnte HSA-Partikel eine RFI von $0,67 \pm 0,10$ % erreichen. Bei BodiPy™-Konzentration von $0,66 \mu\text{g/ml}$ stieg die RFI auf $1,45 \pm 0,20$ %, bei $0,33 \mu\text{g/ml}$ auf $3,15 \pm 0,12$ % sowie bei $0,16 \mu\text{g/ml}$ auf $4,96 \pm 0,51$ %. Dagegen konnten HSA-WGA-Partikel um durchschnittlich 40 % besser binden. Unverdünnte WGA-Partikel ergaben eine RFI von $0,94 \pm 0,13$ % ($1,31 \mu\text{g/ml}$ BodiPy™). Bei $0,66 \mu\text{g/ml}$ BodiPy™ wurde eine RFI von $2,19 \pm 0,15$ % detektiert und weitere Verdünnungen ergaben RFI-Werte von $4,44 \pm 0,56$ ($0,33 \mu\text{g/ml}$ BodiPy™) und $6,22 \pm 0,30$ ($0,16 \mu\text{g/ml}$ BodiPy™).

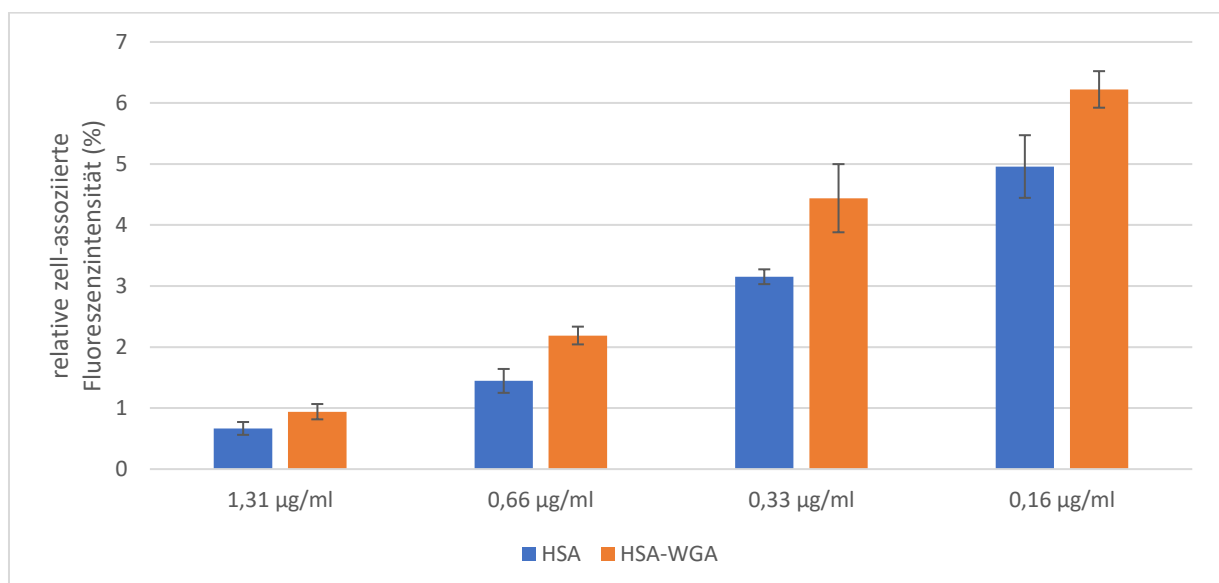


Abbildung 13: Bindungsstudien an Monolayern mit SV-HUC-1-Zellen.

3.3.3 Bindungsstudien am Cellcube

Da die hergestellten Nanokapseln aufgrund ihres Kerns aus Olivenöl zum Aufräumen neigen, ist die Partikel-Adhäsion an den Zellmonolayer limitiert. Um das Aufschwimmen der Nanokapseln während der Inkubationszeit zu verhindern, wurden Bindungsstudien an speziell angefertigten Cellcubes durchgeführt. Dadurch wird eine Verbesserung der Partikel-Bindung an die Zellen erwartet, da die Nanokapseln nicht die Möglichkeit haben aufzusteigen, und somit eine längere Kontaktzeit mit den Zelllayern besteht.

Die Ergebnisse in Abbildung 14.A zeigen die signifikant bessere Bindung von HSA-WGA-Nanokapseln an 5637-Zellen. So ergaben HSA-Partikel eine RFI von lediglich $6,97 \pm 0,62$ % ($1,31 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM) bzw. $7,85 \pm 2,09$ % ($0,66 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM). Unverdünnte WGA-Partikel konnten in diesem Versuch hingegen um 1,79-fach besser an die Zellen adhären. Die Nanokapseln mit WGA erreichten dabei eine RFI von $12,49 \pm 1,61$ % ($1,31 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM) bzw. $13,60 \pm 2,04$ % ($0,66 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM).

Bei SV-HUC-1-Zellen (Abbildung 14.B) konnten erneut wie in vorigen Zellversuchen ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Während unverdünnte HSA-Partikel eine RFI von $2,87 \pm 0,30$ % ($1,31 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM) ergaben, konnte bei WGA-Partikeln eine RFI von $4,26 \pm 0,49$ % ($1,31 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM) festgestellt werden. Somit zeigten Partikel, die mit einem Targeter-Molekül ausgestattet sind, eine um 48 % bessere Bindung an die Zellen im Vergleich zu HSA-Partikeln. Auch 1:2-verdünnte Partikel zeigten ähnliche Unterschiede. So wurde bei HSA-Partikeln eine RFI von $2,79 \pm 0,35$ % ($0,66 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM) und bei WGA-Partikeln eine RFI von $3,92 \pm 0,54$ % ($0,66 \mu\text{g/ml}$ BodiPyTM) detektiert.

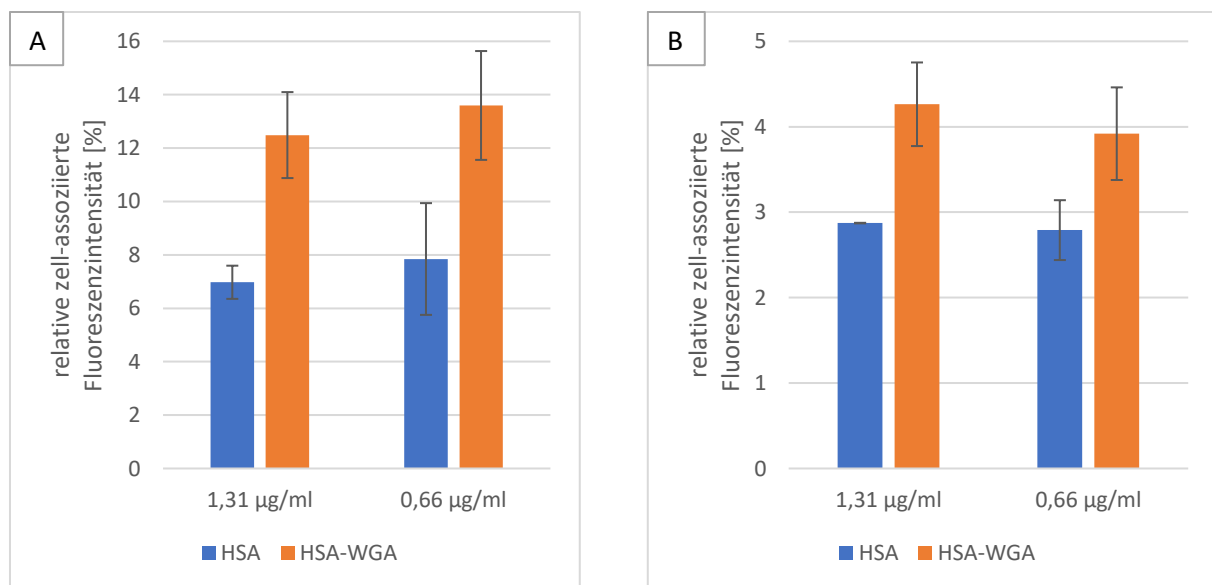


Abbildung 14: Cellcube-Bindungsstudien an (A) 5637-Zellen und (B) SV-HUC-1-Zellen.

3.3.4 Vergleich der Bindungsstudien an Monolayern und Cellcubes

In Abbildung 15.A ist die RFI von HSA- und HSA-WGA-Nanokapseln im Vergleich zwischen 5637-Monolayern und -Cellcubes dargestellt. Dabei konnte die RFI von unverdünnten HSA-Partikeln von $2,00 \pm 0,39$ % beim Monolayer auf $6,97 \pm 0,62$ % beim Cube gesteigert werden, was einer RFI-Erhöhung von 248 % entspricht. Bei Partikeln mit WGA wurde sogar eine Steigerung um das 5,13-fache erreicht – von $2,44 \pm 0,01$ % beim Monolayer auf $12,49 \pm 1,61$ % beim Cube.

Abbildung 15.B veranschaulicht den analogen Vergleich an SV-HUC-1-Zellen. Bei unverdünnten HSA-Nanokapseln konnte die RFI von $0,67 \pm 0,10$ % beim Monolayer auf $2,87 \pm 0,30$ % beim Cube erhöht werden. Das bedeutet auch hier eine Zunahme der RFI um 331 %. Unverdünnte HSA-WGA-Nanokapseln zeigten beim Monolayer eine RFI von $0,94 \pm 0,13$ % im Vergleich zu $4,26 \pm 0,49$ % beim Cube, was einer Erhöhung um 353 % entspricht.

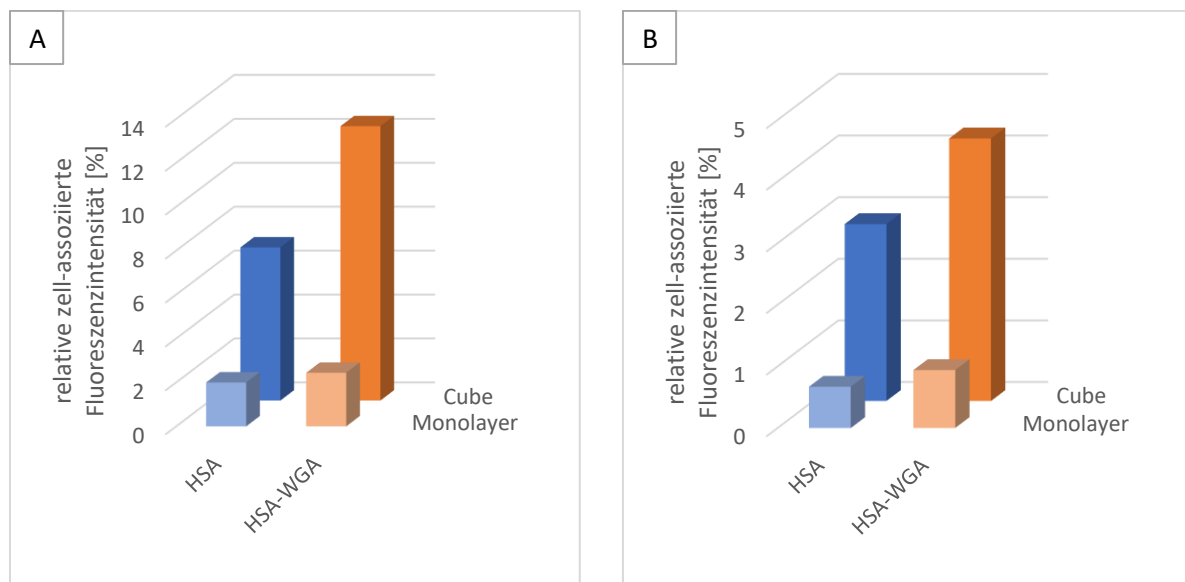


Abbildung 15: Vergleich der Bindung von unverdünnten Protein-Nanokapseln zwischen Monolayer und Cube an (A) 5637-Zellen und (B) SV-HUC-1-Zellen.

Durch Verwendung der Cellcubes konnte die relative zell-assoziierte Fluoreszenzintensität bei gleich eingesetzter Konzentration, gemessen am Farbstoff BodiPyTM, signifikant gesteigert werden. Der Unterschied in der RFI zwischen Protein-Nanokapseln mit und ohne WGA ist sowohl beim Monolayer als auch beim Cellcube deutlich zu erkennen. Bei Cellcube-Versuchen mit 5637-Zellen konnte dieser Unterschied sogar um 413 % ausgebaut werden, wobei die Bindung der HSA-WGA-Nanokapseln generell höher ist als bei SV-HUC-1-Zellen. Dies ist dadurch erklärbar, dass maligne Urothelzellen vermehrt über Oberflächenstrukturen wie

N-Acetyl-D-Glucosamin- und Sialinsäure-Reste verfügen, an welche WGA spezifisch binden kann [8].

Die durchwegs bessere Zelladhäsion von Nanokapseln mit WGA als Hüllkomponente bestätigt, dass sich diese Partikel als Transport-Vehikel für Wirkstoffe eignen würden. Die HSA-WGA-Nanokapseln könnten als möglicher Therapieansatz nicht nur bei Blasentumor-Erkrankungen, sondern auch bei rezidivierenden Harnwegsinfektionen einen entscheidenden Vorteil bieten.

3.3.5 Kolokalisationsstudien

Um die Zelladhäsion von HSA- und HSA-WGA-Nanokapseln optisch darzustellen bzw. die Internalisierung der Partikel in die Zellen zu zeigen, wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gemacht. Dazu wurden sowohl Einzelzellen als auch Zellschichten im flexiPERM® der beiden Zelllinien 5637 und SV-HUC-1 untersucht. Für die Aufnahmen wurden Nanokapseln verwendet, die aufgrund des eingebauten Fluoreszenzfarbstoffs BodiPy™ grün gefärbt sind. Um die Partikel von den umliegenden Zellstrukturen zu unterscheiden, wurde der Zellkern mit HOECHST 33342 blau und die Zellmembran mit aWGA rot gefärbt.

Die Zellen wurden einerseits bei 4 °C mit den Nanokapseln inkubiert. Bei dieser Temperatur ist der Zellstoffwechsel eingeschränkt, sodass keine aktive Aufnahme in die Zellen möglich ist und dadurch ausschließlich eine Bindung an die Zelloberfläche erfolgt. Andererseits wurden auch Internalisationsstudien bei 37 °C durchgeführt. Der dabei aktive Metabolismus der Zellen ermöglicht nicht nur eine Bindung, sondern auch die Aufnahme der Nanokapseln in die Zellen.

Die Abbildungen 16 und 17 zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von 5637- und SV-HUC-1-Einzelzellen. Es konnte die Bindung bei 4 °C optisch dargestellt werden, wobei Nanokapseln mit WGA – subjektiv betrachtet – etwas besser gebunden haben als HSA-Partikel. Dies würde auch den Ergebnissen der Bindungsstudien entsprechen. Bei 37 °C wurden die Protein-Nanokapseln in die Zellen aufgenommen. Die Partikel sind teilweise sehr verschwommen dargestellt, da auch Nanokapseln aus anderen Ebenen durchscheinen. Zu sehen ist, dass auch bei 37 °C noch einige HSA-Partikel außen an die Zellmembran gebunden sind, während HSA-WGA-Nanokapseln ausschließlich innen diffus verteilt sind. Dennoch wurden sowohl HSA- als auch HSA-WGA-Partikel aufgenommen, ein Unterschied ist nur schwer festzustellen.

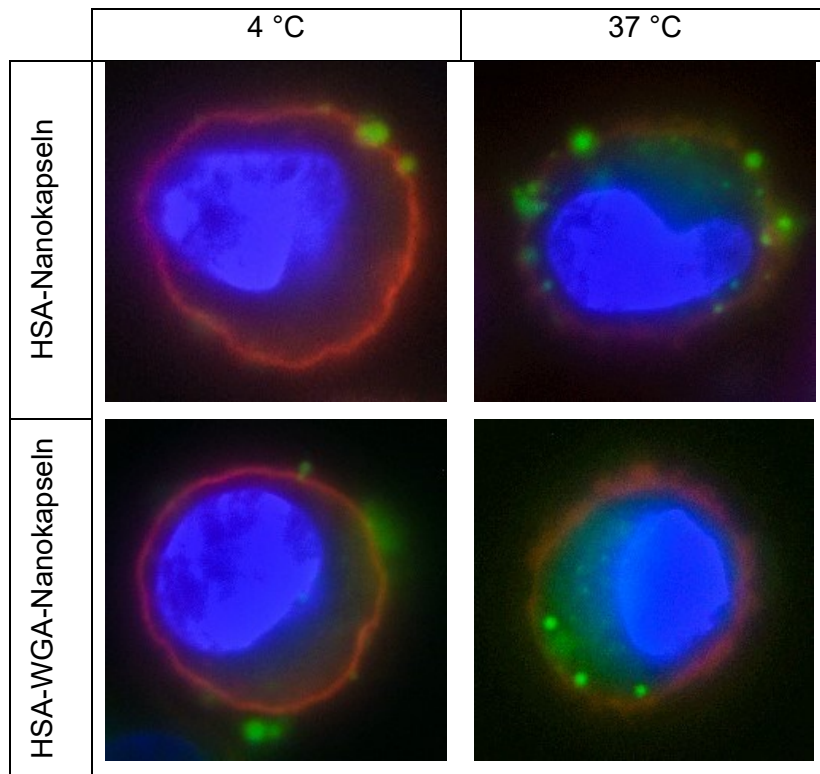


Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 5637-Einzelzellen.

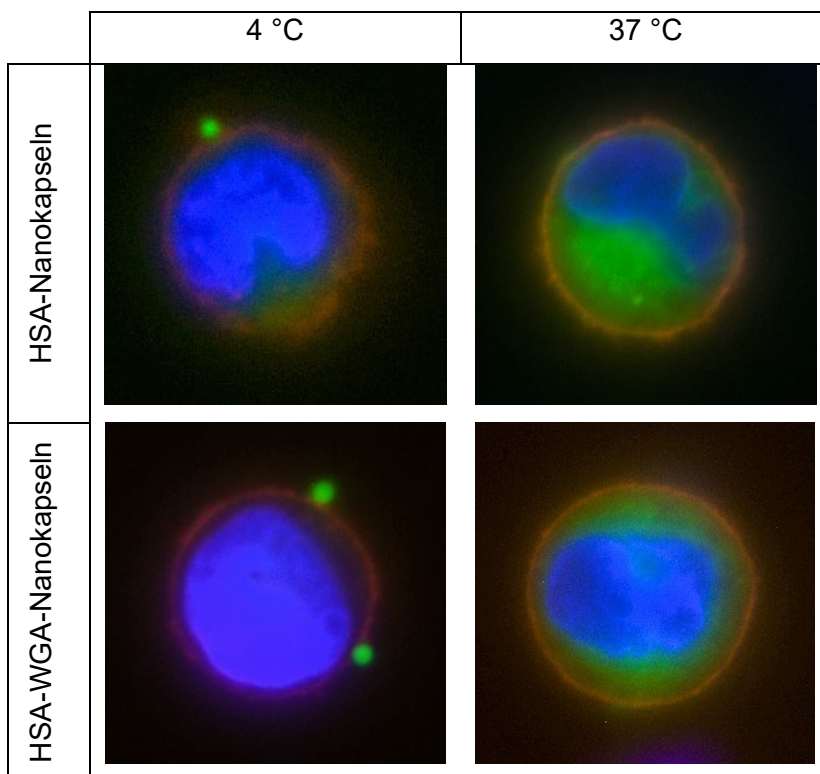


Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von SV-HUC-1-Einzelzellen.

Die Abbildungen 18 und 19 zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von 5637- und SV-HUC-1-Zelllayern. Dabei wurde auch bei 4 °C eine Aufnahme in die Zellen festgestellt. Bei dieser Temperatur dürfte jedoch nur eine Bindung erfolgen, da die aktiven Transportmechanismen minimiert sind. Eventuell wurde beim flexiPERM® keine konstante Kühlung von 4 °C eingehalten, da bei Einzelzellen sehr wohl eine ausschließliche Bindung gezeigt werden konnte. Möglich wäre auch, dass es im Zellverband ungeklärte passive Transportmechanismen gibt, die auch eine Aufnahme der Nanopartikel bei 4 °C ermöglicht. Nichtsdestotrotz konnte bei 37 °C sowohl bei 5637- als auch bei SV-HUC-1-Zellen eine deutlich gesteigerte Internalisierung im Vergleich zu 4 °C dargestellt werden. Da bei 37 °C jedoch so viele Partikel in die Zellen aufgenommen wurden, ist es schwierig, einen optischen Unterschied zwischen HSA- und HSA-WGA-Partikeln festzustellen.

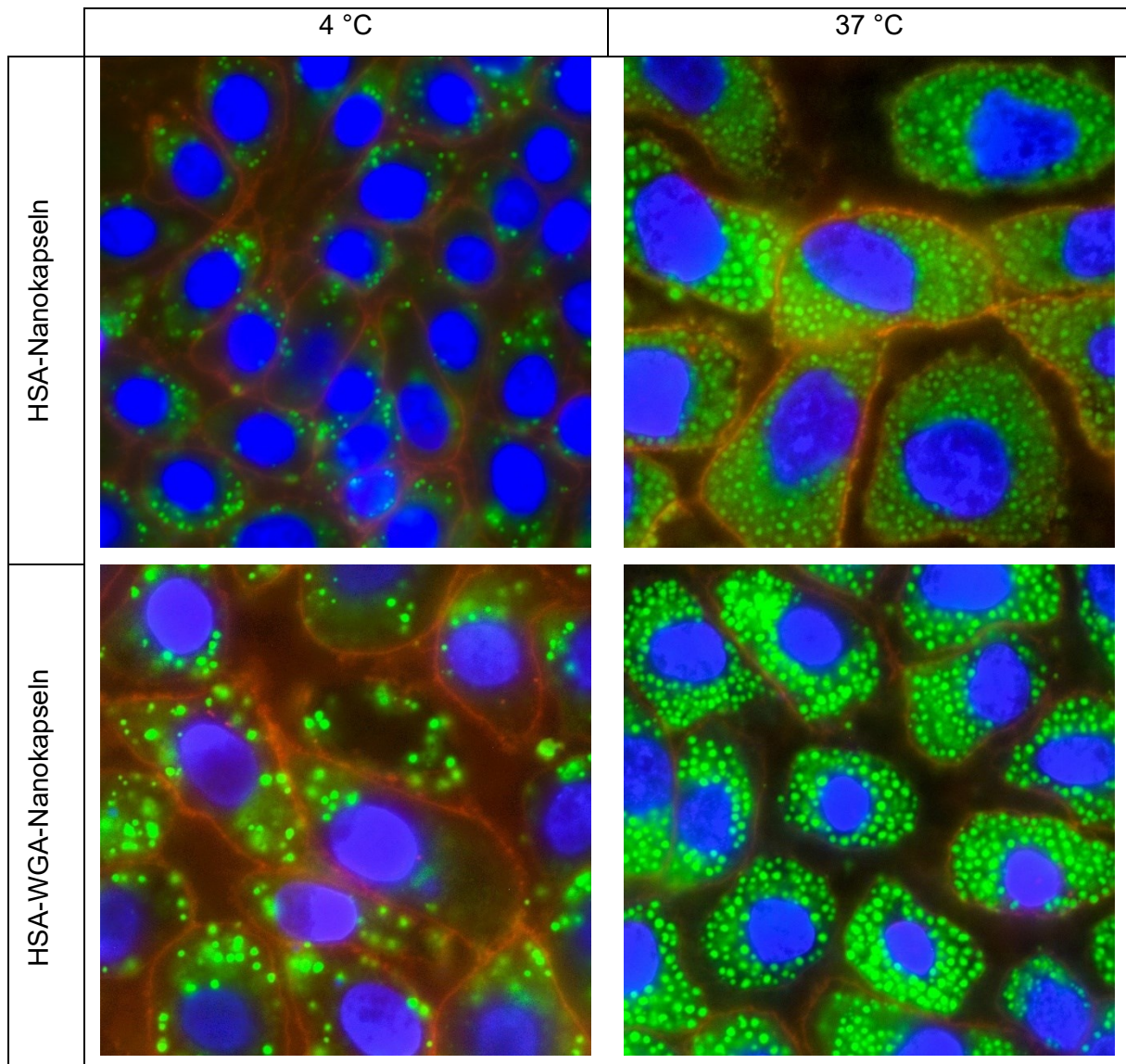


Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 5637-flexiPERM®.

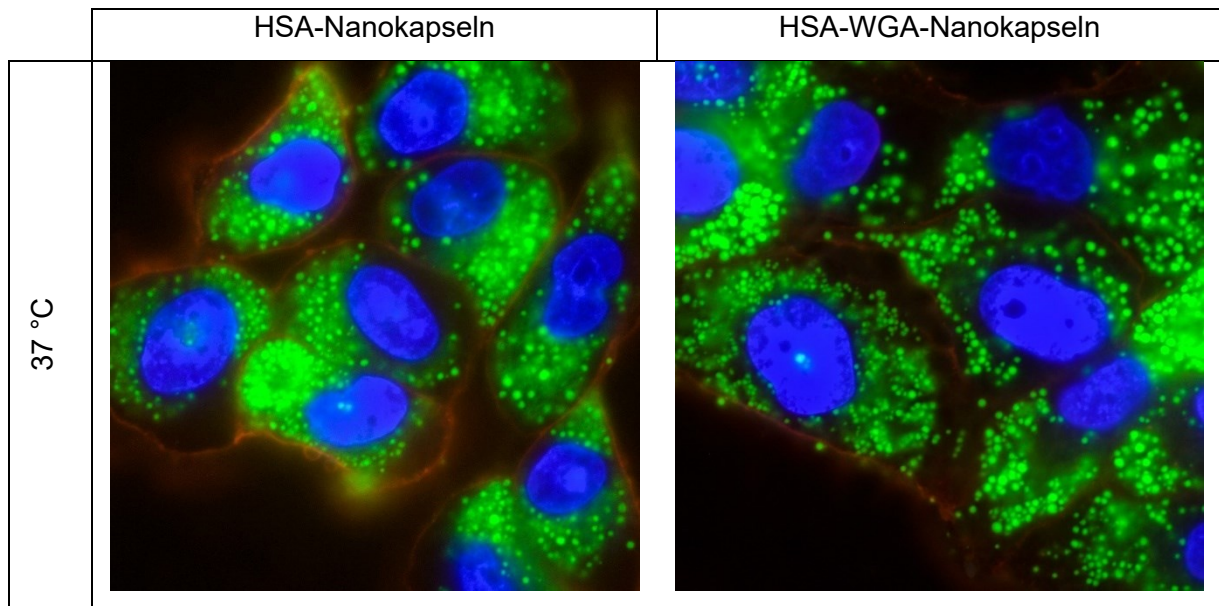


Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von SV-HUC-1-flexiPERM®.

Mit den durchgeführten Kolokalisationsstudien konnten die Ergebnisse der Bindungsstudien bei 4 °C visualisiert werden. Durch die Internalisationsstudien konnte außerdem bewiesen werden, dass die Protein-Nanokapseln bei einer physiologischen Temperatur von 37 °C tatsächlich in die Zellen aufgenommen werden. Zwischen Nanokapseln mit und ohne WGA ist allerdings kaum ein Unterschied feststellbar. Ein Unterschied hinsichtlich der besseren Bindung von HSA-WGA-Nanokapseln konnte jedoch in diversen Versuchen bewiesen werden, welcher hier aufgrund der Menge an Partikeln optisch nicht gezeigt werden konnte.

3.4 Unbedenklichkeit der Protein-Nanokapseln

Anhand eines MTT-Zellviabilitätstests sollte die Unbedenklichkeit der HSA- und HSA-WGA-Nanokapseln in unterschiedlichen Protein-Konzentrationen überprüft werden. Dazu wurden 5637- sowie SV-HUC-1-Zellen 3 bis 4 Tage mit den jeweiligen Partikeln und deren Verdünnungen inkubiert. Die Zelllayer wurden einmal gewaschen und danach wurde das MTT-Reagenz hinzugefügt. Nach 2 Stunden erfolgte die Messung der Extinktion bei 450 nm und einer Referenz bei 620 nm.

In Abbildung 20 ist die Zellviabilität von 5637-Zellen nach einer 3-tägigen Inkubation mit den Nanokapseln dargestellt. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass es – unabhängig von der Protein-Konzentration der HSA- und WGA-Nanopartikel – zu keiner Einschränkung der Proliferation gekommen ist. Im Vergleich zur Positivkontrolle überlebten bei den HSA-Partikeln mit einer Protein-Konzentration von 1 mg/ml $92,44 \pm 9,90$ % und bei den WGA-Partikeln $118,63 \pm 7,65$ % der Zellen. Bei einer Protein-Konzentration von 0,5 mg/ml zeigten die Zellen

eine Viabilität von $114,35 \pm 5,49$ % bei HSA- Partikeln und $126,01 \pm 1,12$ % bei WGA-Partikeln. Auch niedrigere Protein-Verdünnungen von 0,25 bzw. 0,125 mg/ml lassen keine Schlussfolgerung auf eine Zytotoxizität zu.

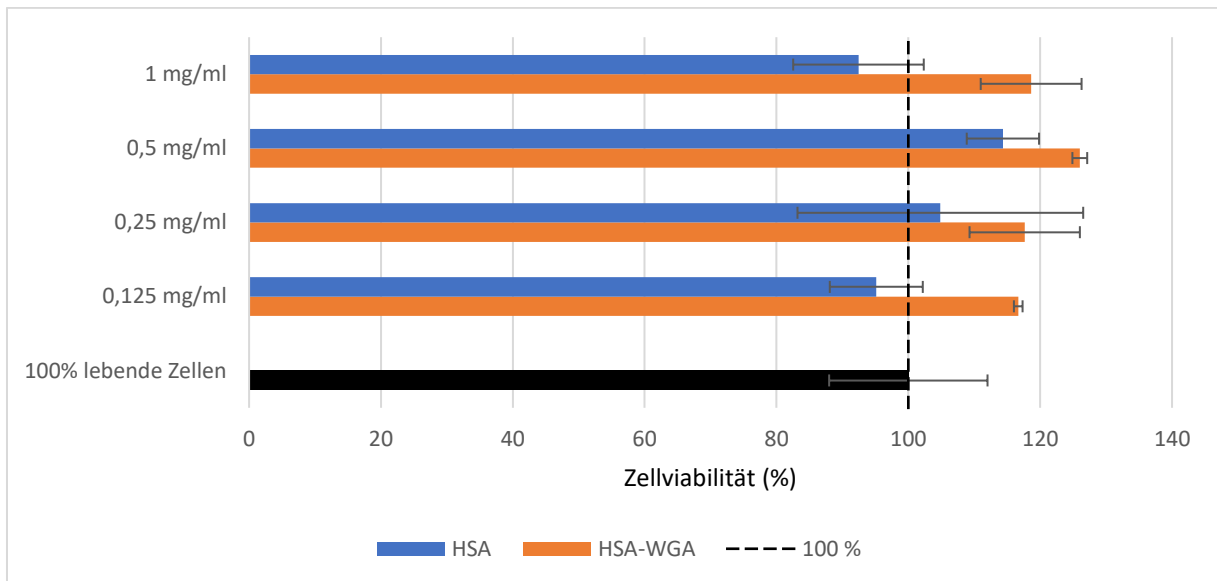


Abbildung 20: Lebende 5637-Zellen (%) nach Inkubation mit Nanopartikeln.

Die Daten in Abbildung 21 zeigen die lebenden SV-HUC-1-Zellen nach einer Inkubation von 4 Tagen mit den Nanokapseln. Verglichen mit der Positivkontrolle wurde bei allen Partikeln eine deutlich höhere Viabilität der Zellen gezeigt. Die HSA-Partikel mit einer Protein-Konzentration von 1 mg/ml ergab eine Zellviabilität von $190,98 \pm 6,29$ % und die WGA-Partikel $170,80 \pm 0,11$ %. Bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml ist die Viabilität nicht signifikant unterschiedlich ($198,63 \pm 11,75$ % bei HSA-Partikeln; $209,40 \pm 5,75$ % bei WGA-Partikeln).

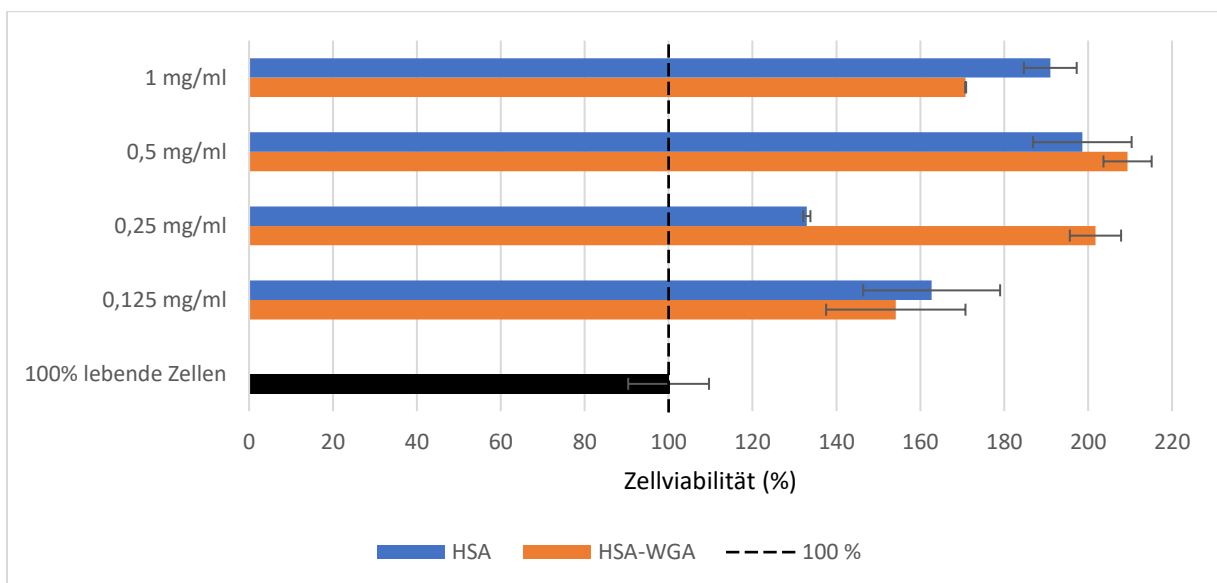


Abbildung 21: Lebende SV-HUC-1-Zellen (%) nach Inkubation mit Nanopartikeln.

Die eingesetzten Zelllinien zeigten unabhängig von der Art der Partikelhülle und der Proteinkonzentration ein uneingeschränktes Wachstum. Somit konnte in diesem Versuch – selbst nach einer Inkubation von 3 bis 4 Tagen – die Unbedenklichkeit der HSA- und HSA-WGA-Nanokapseln bestätigt werden. Dadurch eignen sie sich als sichere Vehikel, um Wirkstoffe in die Zellen zu transportieren, sowohl bei Tumor- als auch bei gesunden Urothelzellen.

Zu beachten ist allerdings, dass bei beiden MTT-Tests deutlich höhere Viabilitäts-Werte – vor allem bei SV-HUC-1-Zellen – im Vergleich zur Positivkontrolle ermittelt wurden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte eine potentielle Störung des Assays durch freie Sulfhydryl (SH)-Gruppen vom HSA der Partikelhülle sein [33]. Wie eingangs erwähnt, werden oxidierte SH-Gruppen des HSA für die Bildung der Proteinhülle benötigt und sind dadurch nicht mehr frei zugänglich. Nach mehrtägiger Inkubation mit den Zellen sind die Nanokapseln jedoch bereits zum Teil zersetzt, wodurch vermutlich wieder freie SH-Gruppen vorliegen. Zwar wurden die Nanokapseln nach der Inkubation abgesaugt und der Zelllayer einmal gewaschen, trotzdem könnten noch Partikel- sowie Proteinreste an den Zellen haften. Dies würde wiederum die höheren Messergebnisse erklären.

Es kann jedoch angenommen werden, dass der „Fehler der erhöhten Messergebnisse“ bei HSA- und HSA-WGA-Partikeln vergleichbar ist. Da HSA aufgrund seines humanen Ursprungs als unbedenklich gilt und sich die Zellviabilität zwischen den beiden Partikelchargen nicht deutlich unterscheidet, kann davon ausgegangen werden, dass mit dem Einführen des Targeters WGA keine Erhöhung der Zytotoxizität einhergeht. Dennoch sollte durch weitere Versuche bzw. mit anderen Testmethoden geklärt werden, inwieweit eine Zytotoxizität von HSA- oder WGA-Nanokapseln vorliegt. Als mögliche Testmethode würde sich ein Bromdesoxyuridin (BrdU)-Test eignen, bei dem markierte Pyrimidin-Basen in die DNA eingebaut werden und so Rückschlüsse auf die Zellproliferation gezogen werden können.

3.5 Freisetzungsstudien von TMP und RIF aus Protein-Partikeln

Im Rahmen der Masterarbeit wurde neben dem Einbau von TMP und RIF auch die Liberation des Wirkstoffes aus den Protein-Partikeln überprüft. Dafür wurden Nanokapseln mit TMP in der Proteinhülle sowie Nano- und Mikrokapseln mit RIF im Ölkern verwendet. Es wurde die Freisetzung in drei unterschiedlichen Medien analysiert. Ein isotoner 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4-Puffer sollte zeigen, ob es während der Lagerung in einem physiologischen Milieu zu einer Freisetzung kommt. Da durch die Kolokalisationsstudien bestätigt wurde, dass die Protein-Partikel auch in die Zellen aufgenommen werden, wurde eine künstliche lysosomale Flüssigkeit (ALF) mit einem pH-Wert von 4,5 verwendet, um die Bedingungen im Zellinneren nachzuahmen. Als drittes Freisetzungsmedium wurde

150 mM HEPES/NaOH pH 7,4 mit 0,1 % Pronase E gewählt. Die Enzymmischung aus verschiedenen Proteasen dient dazu, die Enzyme der Blasenellen wie die Leucin-Aminopeptidase [34] sowie die Enzyme bei Vorhandensein einer bakteriellen Infektion (vgl. 3.6.2 Nachweis mittels MHK) zu imitieren, welche die Proteinhülle der Partikel zersetzen. Die Versuchsansätze wurden bei 37 °C durch End-over-end-Rotation (Stuart Rotator SB3, Cole-Parmer, UK) in Bewegung gehalten. Die Freisetzung erfolgte in einem geschlossenen System als Parallelversuche. Dabei herrschten Sink-Bedingungen, da die jeweiligen Wirkstoff-Konzentrationen deutlich unter 10 % der Sättigungskonzentrationen lagen.

In Abbildung 22 ist zuerst das Freisetzungsprofil von TMP bzw. RIF aus den Protein-Partikeln in isotonem 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4 dargestellt. Auf der y-Achse der Konzentrations-Zeit-Kurve ist dabei der freigesetzte Wirkstoff in % angegeben (released API). Hierbei ist zu sehen, dass es während der ersten 6 Stunden bei keinen Partikeln zu einer deutlichen Freisetzung gekommen ist. Die freigesetzte TMP-Menge schwankte in dieser Zeit zwischen $0,49 \pm 1,16$ % und $7,34 \pm 0,19$ %. Bei RIF-Nanokapseln waren nach 1 Stunde $1,00 \pm 0,09$ % und nach 5 Stunden $4,53 \pm 0,38$ % RIF freigesetzt. Ebenso zeigte sich dieses Freisetzungsprofil bei RIF-Mikrokapseln, bei denen die RIF-Menge zwischen $0,10 \pm 0,32$ % und $2,61 \pm 0,18$ % schwankte. Ursächlich für die geringen Wirkstoff-Mengen ist, dass lediglich der Anteil, der bereits während der Lagerung aufgrund der Zersetzung mancher Partikel bzw. durch Auswaschprozesse in das Medium freigesetzt wird, detektiert wird.

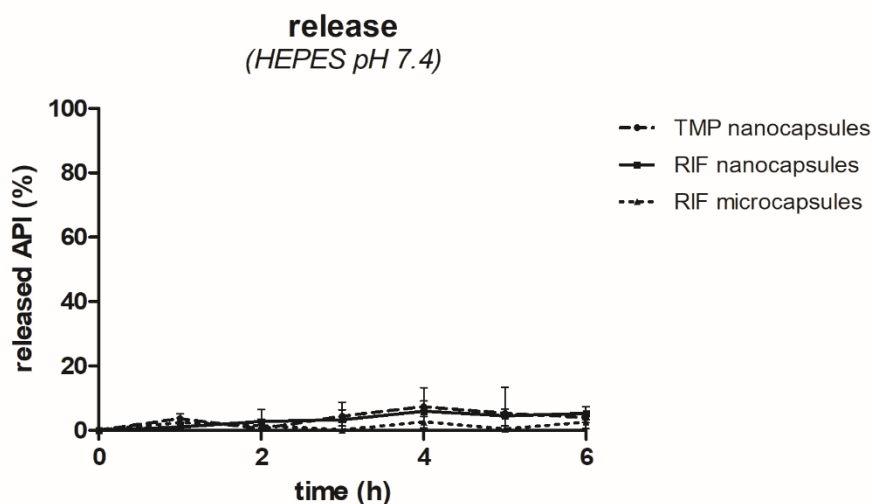


Abbildung 22: Freisetzungsprofil in isotonem 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4.

Abbildung 23 stellt das Freisetzungsprofil der Wirkstoffe in ALF dar. Hier konnte erstmals eine Freisetzung beobachtet werden. Bei TMP waren nach 1 Stunde bereits $24,79 \pm 0,53$ % freigesetzt und nach 2 Stunden $67,87 \pm 0,11$ %, wobei der freigesetzte Anteil bis 6 Stunden

auf diesem Niveau stagnierte ($69,87 \pm 0,15$ %). RIF-Nanopartikel hingegen zeigten eine wesentlich geringere Freisetzung. So waren nach 1 Stunde etwa $13,95 \pm 0,47$ % und nach 6 Stunden $18,58 \pm 0,71$ % freigesetzt. Ähnlich verhielt es sich bei RIF-Mikrokapseln, bei denen minimal weniger freigesetzt wurde als bei RIF-Nanokapseln ($5,31 \pm 0,20$ % nach 1 Stunde; $12,15 \pm 0,12$ % nach 6 Stunden).

Die deutlich erhöhte Liberation von TMP im Vergleich zu RIF liegt daran, dass TMP bei den Nanokapseln an das Hüll-Protein gebunden ist. Durch den sauren pH-Wert von ALF wird diese Proteinhülle zerstört, weshalb auch das durch seine Plasmaproteinbindung angehaftete TMP freigesetzt wird. Bei RIF-Partikeln muss der Wirkstoff jedoch erst aus dem Öl in das Medium diffundieren, selbst wenn es zu einer pH-abhängigen Zerstörung der Partikelhülle kommt. Darüber hinaus ist RIF im sauren Medium sehr schlecht löslich, wodurch sich eine Art Löslichkeitsgleichgewicht einstellt und somit die Freisetzung limitiert ist.

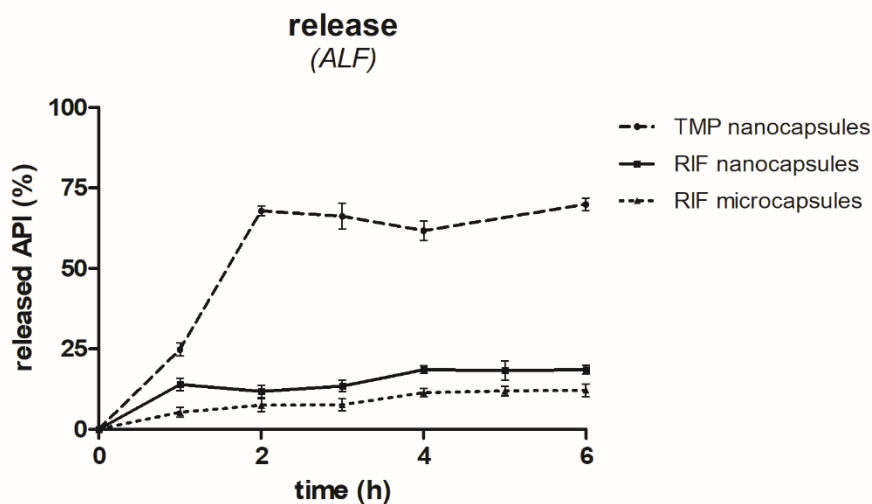


Abbildung 23: Freisetzungsprofil in ALF.

Die Freisetzungsprofile von TMP bzw. RIF aus den Antibiotika-haltigen Protein-Partikeln in 150 mM HEPES/NaOH pH 7,4 mit 0,1 % Pronase E sind in Abbildung 24 gezeigt. Da unklar war, wie lange die zugesetzte Pronase E-Lösung braucht, um die Proteinhülle der Partikel zu zersetzen, wurde hier zusätzlich zum 6-stündigen Freisetzungsversuch auch die Liberation nach 1 bis 4 Tagen in 24 Stunden-Intervallen untersucht.

Bereits 1 Stunde nach Beginn der Freisetzungsstudie stehen $80,44 \pm 1,94$ % TMP zur Verfügung. Dieser hohe initiale Wert lässt sich dadurch erklären, dass TMP nicht in den Kapselkern eingebaut wurde, sondern an das HSA der Proteinhülle gebunden ist. Durch Zusatz von Pronase E und dem dadurch induzierten Abbau des Proteins sowie der guten

Löslichkeit von TMP im Akzeptormedium aufgrund seiner geringen Lipophilie ist der Wirkstoff bereits zu Anfang verfügbar. Die freigesetzte TMP-Menge bleibt über die weiteren Stunden nahezu unverändert. Erst nach mehr als 24 Stunden konnte eine weitere Freisetzung detektiert werden ($94,85 \pm 2,27$ % nach 72 h). Der Versuch endete nach 96 Stunden, wobei zu diesem Zeitpunkt $97,64 \pm 1,42$ % TMP freigesetzt wurden.

Anhand des Freisetzungsprofils von RIF aus den Nanokapseln ist zu erkennen, dass 2 Stunden nach Beginn der Freisetzungsstudie lediglich $8,43 \pm 0,09$ % des Wirkstoffes freigesetzt wurden. Ähnlich wie bei den TMP-Partikeln konnte auch hier erst nach 24 Stunden eine gesteigerte Freisetzung beobachtet werden. Während nach 24 Stunden die RIF-Konzentration noch im Bereich der Ausgangskonzentration lag, wurden nach 48 Stunden bereits $30,66 \pm 0,47$ % und nach 72 Stunden $42,48 \pm 0,17$ % RIF freigesetzt. Am Ende des Versuches nach 96 Stunden konnten immerhin $45,48 \pm 0,09$ % RIF aus den Partikeln freigesetzt werden.

Analog zu RIF-Nanokapseln fand bei RIF-Mikrokapseln in den ersten 6 Stunden keine weitere Freisetzung im Vergleich zum Ausgangswert statt. Hier waren bereits ab der zweiten Stunde $28,84 \pm 0,06$ % RIF freigesetzt. Ab 24 Stunden konnte eine kontinuierliche Liberation erzielt werden, wobei nach 96 Stunden $61,73 \pm 0,19$ % RIF freigesetzt waren. Festzustellen ist, dass aus den RIF-Mikrokapseln mehr freigesetzt werden konnte als aus den Nanokapseln. Eine mögliche Erklärung wäre, dass Nanokapseln eine relativ glatte Oberfläche besitzen, an welche die Pronase E nur schlecht angreifen kann, wodurch der Abbau der Proteinhülle länger dauert. Mikrokapseln hingegen könnten aufgrund des sauren Herstellungspuffers eine andere Oberflächenstruktur aufweisen, die für das Enzym besser zugänglich ist.

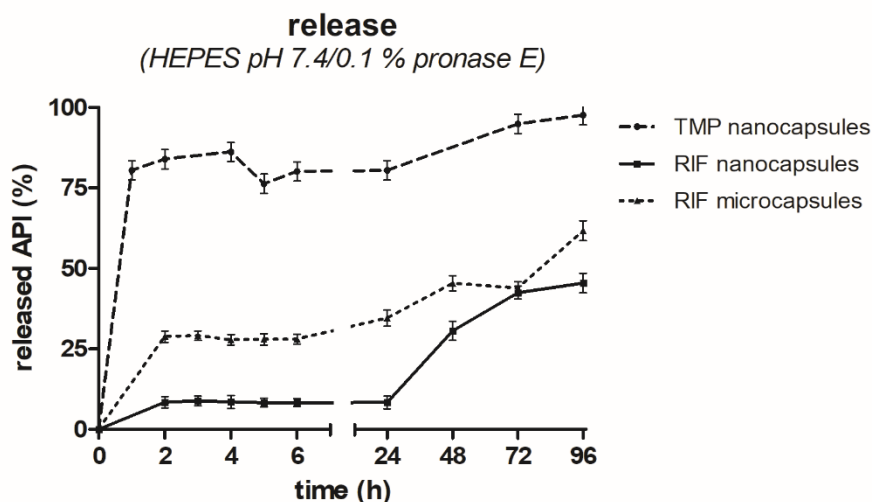


Abbildung 24: Freisetzungsprofil in 150 mM HEPES/NaOH pH 7,4 mit 0,1 % Pronase E.

Die Freisetzungsstudien zeigten, dass es je nachdem, ob der Wirkstoff in der Hülle oder im Kern der Partikel enthalten ist bzw. welches Medium verwendet wurde, Unterschiede in der Liberation gibt. Liegt der Wirkstoff wie bei TMP an das Protein gebunden vor, steht bei ALF und 150 mM HEPES/NaOH pH 7,4 mit 0,1 % Pronase E von Beginn an eine relativ große Wirkstoff-Menge zur Verfügung. Sobald ein Wirkstoff jedoch in den lipophilen Kern der Partikel eingebaut wird wie bei RIF, wird anfangs kaum Wirkstoff freigesetzt. Bei RIF-Partikeln in 150 mM HEPES/NaOH pH 7,4 mit 0,1 % Pronase E kam es erst nach 24 Stunden zu einer gleichmäßigen Freisetzung, wobei in diesem Versuch nach 96 Stunden nur etwa die Hälfte des eingebauten RIF freigesetzt wurde. Bei einem Einbau des Wirkstoffes in den Kern der Nanokapseln sind somit weitere Studien über einen längeren Zeitraum notwendig, um die Dauer bis zur Freisetzung des gesamten Wirkstoffes aus den Partikeln festzustellen. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob durch Zusatz von lysosomalen Enzymen zu ALF die Freisetzung gesteigert werden kann.

Eine weitere Erkenntnis ist, dass Nanokapseln, welche in der Protein-Hülle einen Wirkstoff mit einer gewissen Plasmaproteinbindung sowie einen lipophilen Wirkstoff im Öl-haltigen Kern enthalten, eine sinnvolle Kombinationsarzneiform wären. Vom Wirkstoff in der Hülle wäre initial eine große Menge verfügbar, während der Wirkstoff im Kern als Retardform mit verzögerter sowie verlängerter Freisetzung fungieren würde.

3.6 Wirksamkeit der TMP- und RIF-Nanokapseln

3.6.1 Nachweis mittels Agardiffusionstests

Um die Wirkung der Antibiotika-haltigen Nanokapseln zu überprüfen, wurden sogenannte Antibiotogramme angelegt. Die Durchführung erfolgte dabei nach den EUCAST-Richtlinien und ist in Abschnitt 2.11.1 beschrieben. Es wurden Nanokapseln mit TMP an das Hüllprotein gebunden bzw. mit RIF im Ölkern verwendet, jeweils als HSA- bzw. HSA-WGA-Variante. Außerdem wurden kombinierte TMP-RIF-Nanokapseln eingesetzt. Von den verwendeten Partikelsuspensionen sowie den Wirkstoff-Lösungen wurde jeweils eine 5 µg Wirkstoff entsprechende Menge aufgetragen.

In Abbildung 25 ist der Effekt von HSA- und HSA-WGA-Nanokapseln ohne Wirkstoff auf Agarplatten mit *E. coli* bzw. *Staph. spp.* zu sehen. Dabei ist zu erkennen, dass die reinen Transport-Vehikel keine Auswirkung auf das Wachstum der Bakterien haben. Anzumerken ist, dass auf der *Staph. spp.*-Agarplatte rechts unten 3 fremde Pilz-Kolonien mit eigenem Hemmhof gewachsen sind.

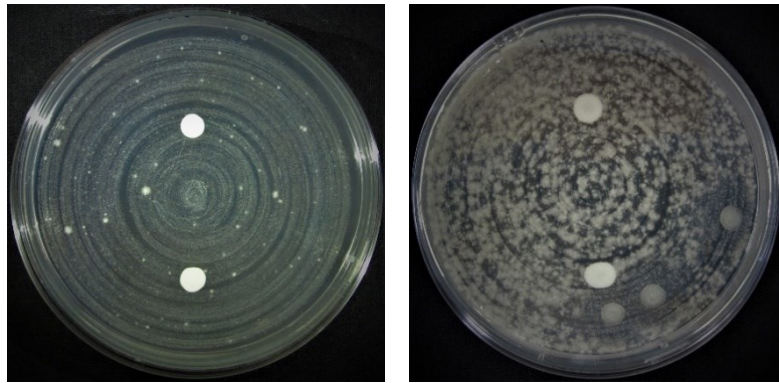


Abbildung 25: Vergleich von Agarplatten mit HSA- (oben) bzw. HSA-WGA-Nanokapseln (unten) ohne Wirkstoff auf *E. coli* (links) und *Staph. ssp.* (rechts).

Da Trimethoprim ein gängiger Wirkstoff gegen *E. coli*-Infektionen ist, sollte dieser eigentlich das Bakterienwachstum hemmen. In Abbildung 26.A ist jedoch zu erkennen, dass die TMP-Nanokapseln in diesem Versuch keine Wirkung erzielen konnten. Anders als erwartet, zeigte die TMP-Lösung ebenso keinen klar begrenzten Hemmhof, da per Definition ein solcher erst ab 6 mm Radius gilt. Laut EUCAST wird hingegen ein Durchmesser von über 15 mm erwartet [28].

Sowohl die RIF-Lösung als auch die RIF-Nanokapseln zeigten bei *E. coli* eine schwache Wirkung, wobei das Wachstum lediglich minimiert, aber nicht vollständig gehemmt wurde (Abbildung 26.B). Ebenso wird die Wirksamkeit der RIF-Nanokapseln in Abbildung 26.C bestätigt, TMP-Partikel hingegen wirkten nicht. Die kombinierten Partikel aus TMP und RIF zeigten eine Wirkung, wobei fraglich ist, ob diese nur aufgrund des enthaltenen Rifampicins erzielt wurde.

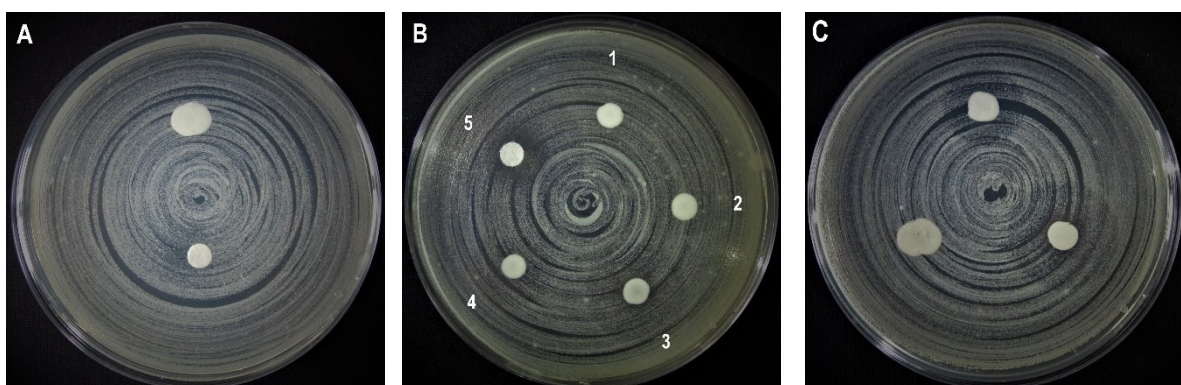


Abbildung 26: Vergleich von *E. coli*-Agarplatten mit Wirkstoff-Lösungen und Wirkstoff-Nanokapseln. (A) TMP-Nanokapseln (oben) und TMP-Lösung (unten). (B) mit (1) HSA-Nanokapseln, (2) HSA-WGA-Nanokapseln, (3) RIF-HSA-Nanokapseln, (4) RIF-HSA-WGA-Nanokapseln, (5) RIF-Lösung. (C) TMP-RIF-HSA-Nanokapseln (oben), RIF-HSA-Nanokapseln (rechts) und TMP-HSA-Nanokapseln (links).

Wie erwartet, zeigte Rifampicin auf *Staph. ssp.* eine deutliche Wirksamkeit (Abbildung 27.A). Hier sind die Hemmhöfe der RIF-Nanokapseln mit jenem Hemmhof der RIF-Lösung vergleichbar. Laut EUCAST wird bei RIF ein Hemmhof mit einem Durchmesser ≥ 26 mm erwartet [28], was hierbei erreicht worden ist. Die Hemmhöfe zeigten jedoch sowohl bei der RIF-Lösung als auch bei den RIF-Nanokapseln keine klaren Zonen und somit keine vollständige Abtötung, sondern lediglich ein stark reduziertes Wachstum der Bakterien.

Trotz UV-Sterilisation ist auf der Filterscheibe, die mit TMP-Lösung präpariert war, ein fremder Keim gewachsen (Abbildung 27.B). Interessanterweise konnten TMP-haltige HSA-WGA-Nanokapseln bei *Staph. ssp.* einen kleinen Hemmhof erzeugen, der jedoch mit dem Hemmhof der TMP-Lösung verschmolzen ist.

Kombinierte Nanokapseln mit TMP und RIF konnten eine Wirkung erzielen, trotz geringerer TMP- bzw. RIF-Konzentration (Abbildung 27.C). Der Gesamtwirkstoff-Gehalt war mit 5 μg , aufgeteilt auf 2,5 μg TMP sowie 2,5 μg RIF, jedoch gleich hoch wie der Wirkstoff-Gehalt der anderen Partikelproben. TMP-HSA-Partikel konnten auf dieser Agarplatte sogar einen noch größeren Hemmhof, als in Abbildung 27.B dargestellt, erzeugen. Hier wurde die Partikelsuspension mit einem TMP-Gehalt von 5 μg auf mehrere Male aufgetragen, was eventuell zur Folge hatte, dass der Wirkstoff portionsweise in den Agar diffundieren konnte und das Risiko des Antrocknens somit minimiert wurde. Dadurch konnte ein Hemmhof mit einem Durchmesser von 21 mm entstehen, wobei laut EUCAST ein Hemmhof ≥ 14 mm als empfindlich gilt [28].

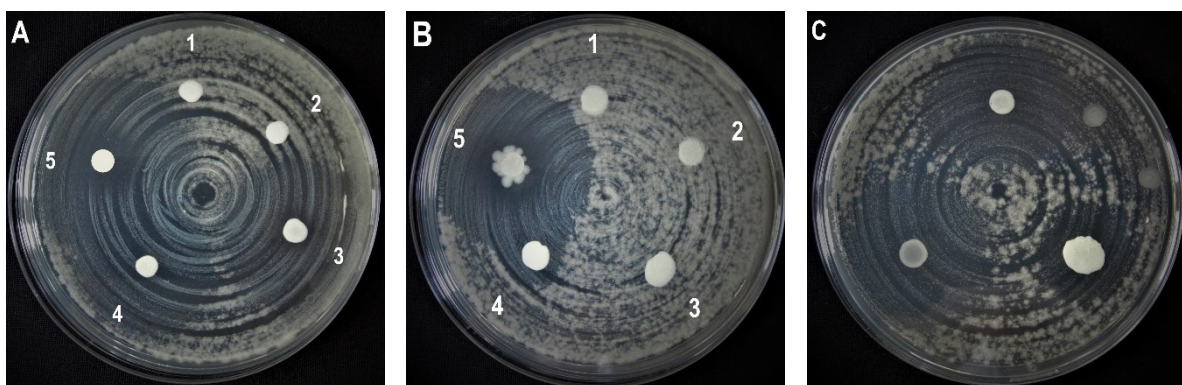


Abbildung 27: Vergleich von *Staph. ssp.*-Agarplatten mit Wirkstoff-Lösungen und Wirkstoff-Nanokapseln.

(A) mit (1) HSA-Nanokapseln, (2) HSA-WGA-Nanokapseln, (3) RIF-HSA-Nanokapseln, (4) RIF-HSA-WGA-Nanokapseln, (5) RIF-Lösung.

(B) mit (1) HSA-Nanokapseln, (2) HSA-WGA-Nanokapseln, (3) TMP-HSA-Nanokapseln, (4) TMP-HSA-WGA-Nanokapseln, (5) TMP-Lösung.

(C) TMP-RIF-HSA-Nanokapseln (oben), TMP-HSA-Nanokapseln (rechts) und RIF-HSA-Nanokapseln (links).

Die antibiotische Wirkung mittels Agardiffusionstests nachzuweisen, ist für die Protein-Nanokapseln nicht unbedingt die geeignete Methode. Der Wirkstoff muss erst vom Kapsel-Protein abgespalten werden (TMP) bzw. aus den Partikeln diffundieren (RIF), um eine Wirkung zu erzielen. Die Problematik besteht allerdings darin, dass die Partikelsuspension an der Oberfläche antrocknet. Dadurch kann der Wirkstoff nicht mehr in Lösung gehen, da die geringe Feuchtigkeit des Agars hierfür nicht ausreicht. Folglich können die Antibiotika-Partikel während der Inkubationszeit nicht ihr volles bakteriostatisches bzw. bakterizides Potential entfalten.

RIF-Nanokapseln konnten jedoch im Gegensatz zu TMP-Partikel sowohl auf *E. coli* als auch auf *Staph. ssp.* generell eine gute Wirksamkeit erzielen. Dies liegt daran, dass laut EUCAST die Empfindlichkeit von *Staph. ssp.* gegenüber RIF mit einer Konzentration $\leq 0,06 \mu\text{g/ml}$ wesentlich geringer ausfällt als bei TMP mit $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ [28]. Bei RIF-haltigen Nanokapseln wurde die empfindliche Konzentration mit $5 \mu\text{g}$ aufgetragenem Wirkstoff somit deutlich überschritten, wodurch selbst, wenn nur geringe Mengen in Lösung gehen, eine Wirkung möglich ist. Bei TMP-Nanokapseln hingegen ist jene Konzentration deutlich höher ($4 \mu\text{g/ml}$), jedoch wird durch das Antrocknen der Partikel die benötigte Konzentration im Agar nicht erreicht. Für RIF gegen *E. coli* sind in den EUCAST-Richtlinien keine Grenzwerte angegeben [28].

In weiterer Folge wurde ein Wirksamkeitsnachweis mittels Minimaler Hemmkonzentration (MHK) durchgeführt, da hierbei die Partikel in Suspension vorliegen, wodurch u. a. eine Diffusion ermöglicht wird und die Problematik der Antibiotogramme umgangen wird.

3.6.2 Nachweis mittels Minimaler Hemmkonzentration (MHK)

Um die zuvor beschriebene Problematik der Antibiotogramme zu umgehen, wurde die Wirksamkeit der Antibiotika-haltigen Nanokapseln auch mittels MHK bestimmt. Diese gibt jene Konzentration wieder, bei der gerade noch kein Bakterienwachstum auftritt und das Antibiotikum somit einen bakteriostatischen bzw. bakteriziden Effekt zeigt.

Für den Wirksamkeitsnachweis wurde zunächst eine Verdünnungsreihe wie in Abschnitt 2.11.2.2 beschrieben angelegt. Da die Partikelsuspensionen eine starke Trübung aufweisen, wurde vor der Inkubation von jeder Epruvette ein Ausgangswert photometrisch bei 600 nm bestimmt. Nach der Inkubation wird vom erhaltenen Messergebnis der entsprechende Leerwert abgezogen, um von der entstandenen Trübung auf das Bakterienwachstum zu schließen.

In Abbildung 28.A ist die Verdünnungsreihe vor der Inkubation zu sehen, wobei die abnehmende Trübung der Partikel wahrnehmbar ist. Die Abbildung 28.B zeigt dieselbe Verdünnungsreihe nach einer 22-stündigen Inkubation. Hierbei ist subjektiv betrachtet etwa ab der 7. Eprovette auch visuell eine stärkere Trübung zu erkennen, was auf ein Bakterienwachstum schließen lässt.

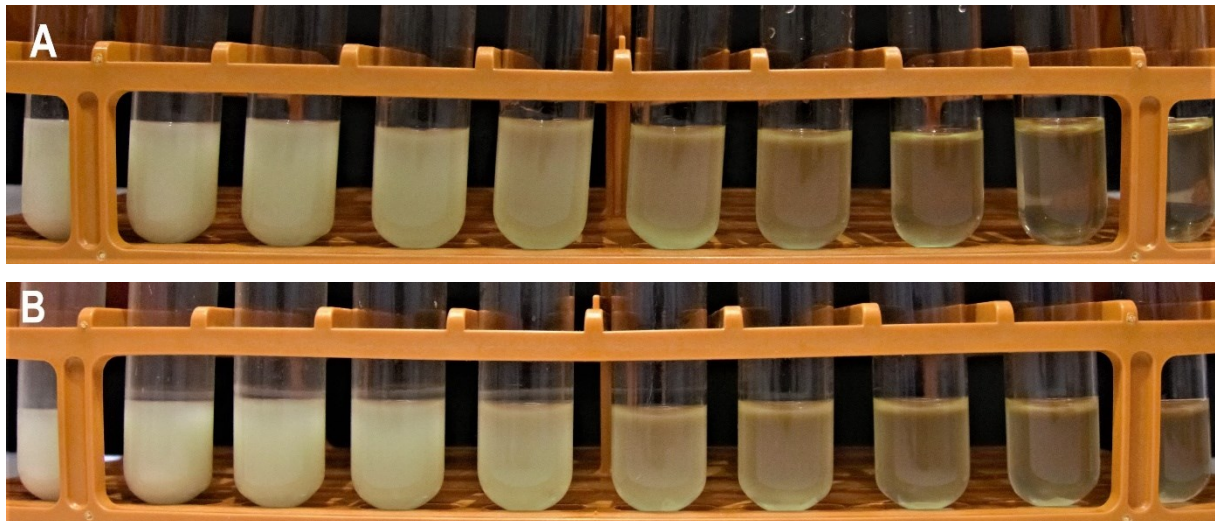


Abbildung 28: MHK-Verdünnungsreihe (A) vor Inkubation und (B) nach 22-stündiger Inkubation.

In Abbildung 29 wird die MHK von TMP-Nanokapseln im Vergleich zu einer TMP-Lösung bei *E. coli* dargestellt. Dabei zeigt die TMP-Lösung nach 22 Stunden eine MHK von 10 µg/ml. Bei TMP-Nanopartikeln konnte nach Abzug des Ausgangswertes hingegen erst ab der 7. Verdünnung (0,31 µg/ml TMP) ein Bakterienwachstum detektiert werden. Damit beträgt die MHK der TMP-Nanokapseln 0,63 µg/ml und wirkt somit deutlich besser als die reine Wirkstoff-Lösung.

Bei einer TMP-Konzentration von 0,16 µg/ml sind bei beiden Arzneiformen mit 240 ± 79 Mio. KBE/ml bei der TMP-Lösung bzw. 250 ± 56 Mio. KBE/ml bei TMP-Nanokapseln etwa gleich viele Bakterien vorhanden. Danach steigt die Bakterienkonzentration bei TMP-Nanopartikeln bis zu einem Maximum von 600 ± 19 Mio. KBE/ml an, während die Bakterien bei der TMP-Lösung bei einer niedrigeren Anzahl bleiben (257 ± 37 Mio. KBE/ml).

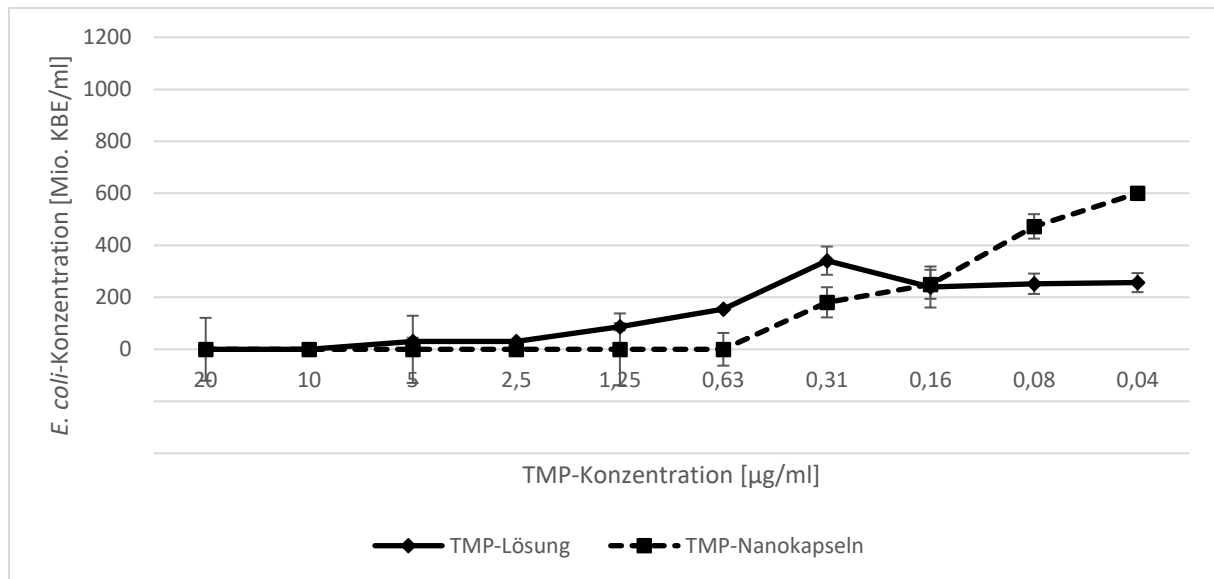


Abbildung 29: MHK von TMP-Nanokapseln im Vergleich zu TMP-Lösung gegenüber *E. coli*.

Ebenso wurde die MHK von RIF-Nanokapseln und einer RIF-Lösung gegenüber *Staph. ssp.* getestet (Abbildung 30). Hierbei ist zu erkennen, dass die RIF-Lösung in dieser Verdünnungsreihe keine bakterizide Wirkung erzielen konnte. Hierfür müssten bei weiteren Versuchen höhere Konzentrationen von RIF getestet werden. RIF-Nanokapseln konnten hingegen eine MHK von 1,25 µg/ml erreichen. Auch hier ist ab einer Wirkstoff-Konzentration von 0,16 µg/ml eine etwas höhere Bakterienkonzentration bei RIF-Nanokapseln im Vergleich zur RIF-Lösung zu sehen.

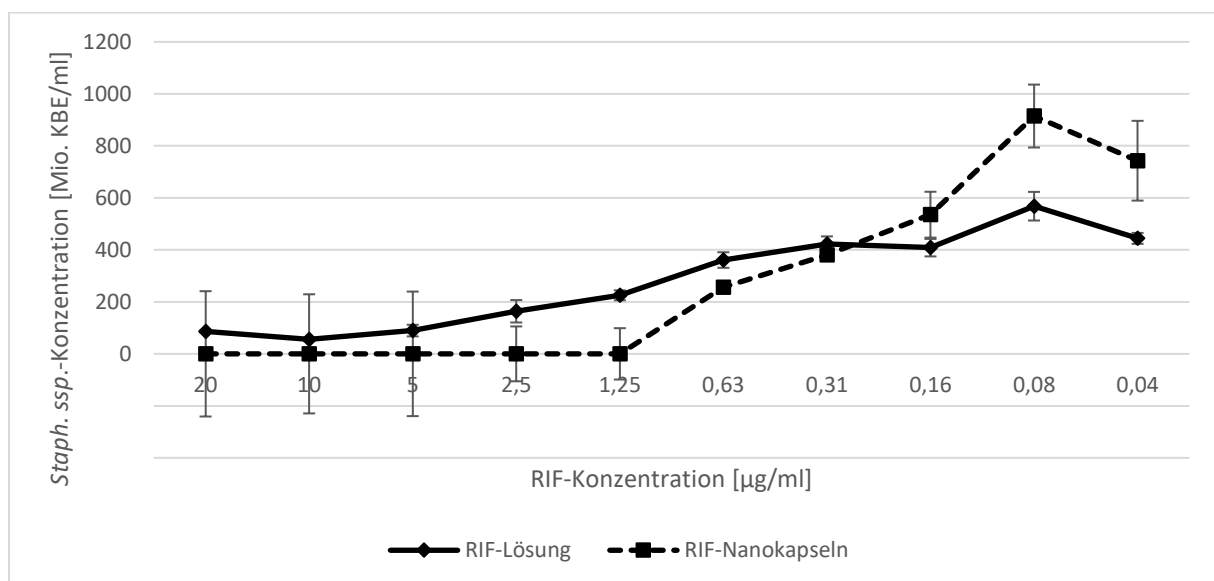


Abbildung 30: MHK von RIF-Nanokapseln im Vergleich zu RIF-Lösung gegenüber *Staph. ssp.*

Des Weiteren wurden auch Versuchsreihen mit kombinierten TMP-RIF-Nanokapseln durchgeführt (Abbildung 31). Dabei ergab sich bei *E. coli* eine MHK von 0,34 µg/ml TMP und 0,39 µg/ml RIF, sprich eine Gesamtkonzentration von 0,73 µg/ml Wirkstoff. Das bedeutet, dass im Vergleich zu TMP-Nanokapseln keine Verringerung der MHK beobachtet werden konnte. Durch die Kombination der zwei Antibiotika konnte jedoch die TMP-Konzentration gesenkt werden. Dies könnte bei einer späteren Anwendung bei Harnwegsinfektionen zu einer deutlichen Reduktion von TMP-induzierten Nebenwirkungen führen.

Bei *Staph. ssp.* wurde durch die kombinierten Nanopartikel eine MHK von 0,68 µg/ml TMP und 0,78 µg/ml RIF, entsprechend einer Gesamtkonzentration von 1,46 µg/ml Wirkstoff erzielt. Somit konnte auch hier im Vergleich zu einer MHK von 1,25 µg/ml bei RIF-Nanokapseln keine niedrigere MHK erreicht werden. Allerdings konnte durch die Antibiotika-Kombination die absolute RIF-Konzentration reduziert werden, wodurch eventuell Resistenzen verhindert werden können.

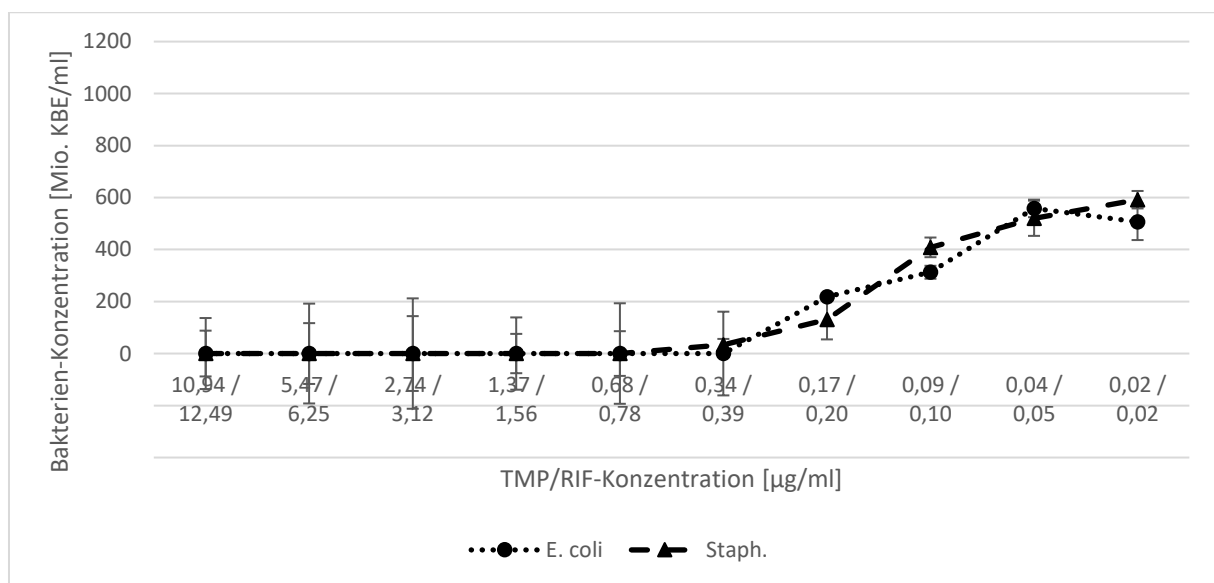


Abbildung 31: MHK von TMP-RIF-Nanokapseln gegenüber *E. coli* im Vergleich zu *Staph. ssp.*

Zusammenfassend ergaben die Untersuchungen, dass die Antibiotika-haltigen Nanokapseln deutlich niedrigere minimale Hemmkonzentrationen aufweisen als die entsprechenden Wirkstoff-Lösungen. Kombinierte TMP-RIF-Nanokapseln konnten zwar die MHK des Gesamtwirkstoffes nicht weiter senken, sehr wohl aber die Konzentrationen der einzelnen Antibiotika. Durch die Wirkung bei niedrigeren Antibiotika-Konzentrationen können auch die Nebenwirkungen einer Behandlung reduziert werden.

Im Vergleich zu den durchgeführten Freisetzungsstudien (Abschnitt 3.5) konnte hier schon innerhalb von 22 Stunden ausreichend Wirkstoff freigesetzt werden, um eine Wirkung zu erzielen. Zurückzuführen ist dies auf vorhandene Enzyme. Sowohl *E. coli* als auch *Staph. ssp.* sezernieren verschiedene proteinspaltende Enzyme wie Serinproteasen, Metalloproteasen oder Cysteinproteasen. Diese Exoenzyme spielen u. a. eine wichtige Rolle in der Pathogenese von extraintestinal pathogenen *E. coli* und Staphylokokken [35, 36, 37]. Die Proteasen führen aber auch dazu, dass die Protein-Hülle der Antibiotika-haltigen Nanokapseln zerstört und dadurch der enthaltene Wirkstoff freigesetzt wird. In weiteren MHK-Studien sollte über einen längeren Zeitraum untersucht werden, wie lange die Wirkung der Antibiotika-haltigen Nanokapseln anhält und ob die Partikel dahingehend einen weiteren Vorteil gegenüber Antibiotika-Lösungen bieten.

4 Conclusio

Im Zuge der Masterarbeit wurden Protein-Nanokapseln mit Olivenöl als Kern und HSA bzw. HSA und WGA als Kapselhülle hergestellt. Nanokapseln mit WGA als Teil der Proteinhülle konnten dabei in sämtlichen Bindungsstudien um 30-40 % höhere RFI-Werte erzielen. Dies zeigte sich auch bei Monolayer-Versuchen, jedoch fielen die Bindungsraten von unverdünnten Nanokapseln mit 0,67 bis 2,44 % generell sehr niedrig aus. Die limitierte Bindung Öl-haltiger Nanokapseln beruht wohl darauf, dass sie aufgrund ihrer geringeren Dichte aufschwimmen und dadurch eine verkürzte Kontaktzeit zum Zellschicht aufweisen. Bindungsstudien zeigten, dass bei Partikeln, die zum Aufrahmen neigen, auf den Cellcube zurückgegriffen werden sollte. Hierbei konnte bei Nanokapseln mit WGA eine bis zu 5-fach höhere Bindung im Vergleich zum Monolayer erzielt werden, da das Aufrahmen der Partikel durch kontinuierliches Rühren minimiert wird.

Um die Bindung der Nanokapseln an Zellen zu überprüfen, wurden alle Bindungsstudien bei 4 °C durchgeführt. Die Aufnahme der Partikel bei physiologischen Bedingungen wurde mittels Kolokalisationsstudien untersucht. Außerdem zeigten MTT-Zellviabilitätstests, dass weder HSA-Nanokapseln noch Nanokapseln mit WGA den humanen Urothelzellen schaden. Die Transport-Vehikel können somit als unbedenklich eingestuft werden.

Durch die Möglichkeit, den Wirkstoff sowohl in den Ölkern einzubauen als auch an das Hüllprotein der Kapseln zu binden, konnte abhängig von den Eigenschaften des Wirkstoffes, ein effizienter Einbau bzw. eine effiziente Beladung erzielt werden. Dabei wurde RIF aufgrund seiner höheren Lipophilie um mehr als das 10-fache effizienter in den Kern eingebaut als TMP. Außerdem ermöglicht die höhere Plasmaproteinbindung von RIF auch eine effiziente Beladung der Proteinhülle. Durch pH-Änderung des Herstellungspuffers konnten überdies auch deutlich größere Partikel hergestellt werden. Dabei wurde aufgrund der schlechten Löslichkeit von RIF im sauren Puffer jedoch kaum Wirkstoff in die Hülle eingebaut.

Damit die Wirkstoff-haltigen Nanokapseln wirken können, muss TMP bzw. RIF zunächst freigesetzt werden. Abhängig davon, ob der Wirkstoff in der Proteinhülle oder im Kern enthalten ist bzw. welches Akzeptormedium verwendet wird, zeigten die Nanokapseln unterschiedliche Freisetzungsprofile. Dabei kam es innerhalb von 6 Stunden zu keiner Freisetzung in isotonem HEPES/NaOH pH 7,4. In einer künstlichen lysosomalen Flüssigkeit mit saurem pH konnten etwa 70 % des an das Hüllprotein-gebundene TMP aufgrund der geänderten PPB freigesetzt werden. Da RIF erst aus dem Ölkern diffundieren muss und RIF im Sauren eine schlechte Löslichkeit aufweist, werden hier in 6 Stunden weniger als 20 % freigesetzt. Nach Zusatz von 0,1 % Pronase E im Freisetzungsmedium konnte nach 96

Stunden TMP nahezu vollständig freigesetzt werden. Bei RIF-haltigen Nanokapseln wurde hingegen nur etwa die Hälfte freigesetzt.

Zur Überprüfung der Wirksamkeit von Wirkstoff-haltigen Nanokapseln wurden abschließend Agardiffusionstests durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass diese keine optimale Methode darstellen. Da die Partikelsuspension auf der Agarplatte antrocknet, kann kein Wirkstoff mehr in Lösung gehen, wodurch die Wirkung limitiert ist. Dies war daran zu erkennen, dass TMP-haltige Nanokapseln im Allgemeinen keine Hemmhöfe zeigten. Aufgrund der Empfindlichkeit der Bakterien gegen wesentlich niedrigere RIF-Konzentrationen, konnten RIF-haltige Nanokapseln gegen *E. coli* und *Staph. ssp.* jedoch eine Wirkung erzielen.

Mithilfe von Verdünnungsreihen wurde stattdessen die Minimale Hemmkonzentration (MHK) ermittelt, da hierbei die Partikel in Suspension vorliegen und somit eine Freisetzung des Wirkstoffes aus den Nanokapseln möglich ist. Die Freisetzung wird dabei zusätzlich durch Enzyme, die von den Bakterien sezerniert werden, beschleunigt. Damit konnte die Wirkung der Partikel bestätigt werden, wobei die MHK deutlich niedriger ausfiel als die der jeweiligen Wirkstoff-Lösungen.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit konnte so ein wichtiger Beitrag zur Entwicklung von Drug Delivery Systemen zur Behandlung von Harnwegsinfektionen geleistet werden. Die bioadhäsiven Eigenschaften der Nanokapseln als Transport-Vehikel konnten durch Einsatz von WGA in der Proteinhülle noch verstärkt werden. Überdies kann so auch eine Zytovasion induziert werden, wodurch das Auswaschen mit dem Urin minimiert werden würde. Die nachgewiesene Freisetzung der Arzneistoffe aus den Nanokapseln ermöglicht bei einer intravesikalen Applikation eine Abgabe des Wirkstoffes direkt am Zielort, womit lokal höhere Konzentrationen bei gleichzeitig geringen Nebenwirkungen erreicht werden. Außerdem konnte eine Wirkung gegen den häufigsten uropathogenen Keim *E. coli* bestätigt werden.

5 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ALF	künstliche lysosomale Flüssigkeit (artificial lysosomal fluid)
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BCA	Bicinchoninsäure (bicinchoninic acid)
BodiPy™	4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FACS	Fluorescence-activated cell scanning
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSA	Humanes Serum Albumin
MeOH	Methanol
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
PDI	Polydispersitätsindex
RFI	relative Fluoreszenzintensität
RIF	Rifampicin
RIF(x;O)-Nanokapseln	Nanokapseln mit RIF im Ölkern (O); x = Menge eingesetzter Wirkstoff
RIF(x;P)-Nanokapseln	Nanokapseln mit RIF in der Proteinhülle (P); x = Menge eingesetzter Wirkstoff
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
Staph. ssp.	Staphylococcus subspecies
TMP	Trimethoprim
TMP(x;O)-Nanokapseln	Nanokapseln mit TMP im Ölkern (O); x = Menge eingesetzter Wirkstoff
TMP(x;P)-Nanokapseln	Nanokapseln mit TMP in der Proteinhülle (P); x = Menge eingesetzter Wirkstoff
UPEC	uropathogene Escherichia coli
UpM	Umdrehungen pro Minute
WGA	Weizenkeimlektin (wheat germ agglutinin)
x g	relative Zentrifugalkraft

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kalibriergerade von HSA in Pluronic® 1 % (m/v) bei 562 nm.....	20
Abbildung 2: HPLC-Kalibriergerade von Trimethoprim bei 280 nm.....	21
Abbildung 3: Kalibriergerade von Rifampicin bei 330 nm.....	22
Abbildung 4: Cellcube (links). Einsetzen eines Deckgläschens in den Cellcube (Mitte). Fertiger Cellcube mit Magnetrührstäbchen (rechts).....	25
Abbildung 5: McFarland-Skala zur Berechnung der Bakterienkonzentration [26].....	30
Abbildung 6: Kalibriergerade für <i>E. coli</i> in Nährbouillon bei 600 nm.....	31
Abbildung 7: Kalibriergerade für <i>Staph. ssp.</i> in Nährbouillon bei 600 nm.....	31
Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Protein-Nanokapseln.....	36
Abbildung 9: Vergleich der LC [%] von TMP- und RIF-Nanokapseln.....	39
Abbildung 10: Bindungsstudie mittels Durchflusszytometer an 5637-Einzelzellen.....	41
Abbildung 11: Bindungsstudie mittels Durchflusszytometer an SV-HUC-1-Einzelzellen.....	42
Abbildung 12: Bindungsstudien an Monolayern mit 5637-Zellen.....	43
Abbildung 13: Bindungsstudien an Monolayern mit SV-HUC-1-Zellen.....	43
Abbildung 14: Cellcube-Bindungsstudien an (A) 5637-Zellen und (B) SV-HUC-1-Zellen.....	44
Abbildung 15: Vergleich der Bindung von unverdünnten Protein-Nanokapseln zwischen Monolayer und Cube an (A) 5637-Zellen und (B) SV-HUC-1-Zellen.....	45
Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 5637-Einzelzellen.....	47
Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von SV-HUC-1-Einzelzellen.....	47
Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 5637-flexiPERM®.....	48
Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von SV-HUC-1-flexiPERM®.....	49
Abbildung 20: Lebende 5637-Zellen (%) nach Inkubation mit Nanopartikeln.....	50
Abbildung 21: Lebende SV-HUC-1-Zellen (%) nach Inkubation mit Nanopartikeln.....	50
Abbildung 22: Freisetzungsprofil in isotonem 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4.....	52
Abbildung 23: Freisetzungsprofil in ALF.....	53
Abbildung 24: Freisetzungsprofil in 150 mM HEPES/NaOH pH 7,4 mit 0,1 % Pronase E.....	54
Abbildung 25: Vergleich von Agarplatten mit HSA- (oben) bzw. HSA-WGA-Nanokapseln (unten) ohne Wirkstoff auf <i>E. coli</i> (links) und <i>Staph. ssp.</i> (rechts).....	56
Abbildung 26: Vergleich von <i>E. coli</i> -Agarplatten mit Wirkstoff-Lösungen und Wirkstoff- Nanokapseln.....	56
Abbildung 27: Vergleich von <i>Staph. ssp.</i> -Agarplatten mit Wirkstoff-Lösungen und Wirkstoff- Nanokapseln.....	57
Abbildung 28: MHK-Verdünnungsreihe (A) vor Inkubation und (B) nach 22-stündiger Inkubation.....	59
Abbildung 29: MHK von TMP-Nanokapseln im Vergleich zu TMP-Lösung gegenüber <i>E. coli</i>	60
Abbildung 30: MHK von RIF-Nanokapseln im Vergleich zu RIF-Lösung gegenüber <i>Staph.</i> <i>ssp.</i>	60

Abbildung 31: MHK von TMP-RIF-Nanokapseln gegenüber E. coli im Vergleich zu <i>Staph. ssp.</i>	61
--	----

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Partikelgröße und des PDI verschiedener Nano- und Mikrokapseln.	34
Tabelle 2: Übersicht der Zetapotentiale verschiedener Nano- und Mikrokapseln.....	36
Tabelle 3: Übersicht der Proteinkonzentrationen von HSA- und HSA-WGA-Nanokapseln....	37
Tabelle 4: Vergleich der LC [%] und EE [%] von TMP-Nanokapseln (n = 3).	38
Tabelle 5: Vergleich der LC [%] und EE [%] von RIF-Nanokapseln (n = 3).	38
Tabelle 6: Übersicht der LC [%] und EE [%] von TMP-RIF-Nanokapseln (n = 3).	39
Tabelle 7: Übersicht der LC [%] und EE [%] von RIF-Mikrokapseln (n = 3).....	40

8 Literaturverzeichnis

- [1] W. E. Stamm und S. R. Norrby, „Urinary Tract Infections: Disease Panorama and Challenges,“ *The Journal of Infectious Diseases*, 183 (Suppl 1), pp. S1-S4, 2001.
- [2] A. Al-Badr und G. Al-Shaikh, „Recurrent Urinary Tract Infections Management in Women,“ *Sultan Qaboos University Medical Journal*, Vol. 13, pp. 359-367, 2013.
- [3] J. J. Martinez, M. A. Mulvey, J. D. Schilling, J. S. Pinkner und S. J. Hultgren, „Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells,“ *The EMBO Journal*, Vol. 19, No. 12, pp. 2803-2812, 2000.
- [4] C. M. Chu und J. L. Lowder, „Diagnosis and treatment of urinary tract infections across age groups,“ *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 219(1), pp. 40-51, 2018.
- [5] C. M. Pichl, B. Dunkl, B. Brauner, F. Gabor, M. Wirth und L. Neutsch, „Biomimicry of UPEC Cytoinvasion: A Novel Concept for Improved Drug Delivery in UTI,“ *Pathogens*, 5(1), 2016.
- [6] P. Tyagi, P.-C. Wu, M. Chancellor, N. Yoshimura und L. Huang, „Recent Advances in Intravesical Drug/Gene Delivery,“ *Mol Pharm*, 3(4), pp. 369-379, 2006.
- [7] A. Z. Wilczewska, K. Niemirowicz, K. H. Markiewicz und H. Car, „Nanoparticles as drug delivery systems,“ *Pharmacological Reports*, 64(5), pp. 1020-1037, 2012.
- [8] L. Neutsch, V. E. Plattner, S. Polster-Wildhofen, A. Zidar, A. Chott, G. Borchard, O. Zechner, F. Gabor und M. Wirth, „Lectin-mediated Biorecognition as a Novel Strategy for Targeted Delivery to Bladder Cancer,“ *Journal of Urology*, 186(4), pp. 1481-1488, 2011.
- [9] K. S. Suslick, M. W. Grinstaff, K. J. Kolbeck und M. Wong, „Characterization of sonochemically prepared proteinaceous microspheres,“ *Ultrasonics Sonochemistry*, Vol 1 No 1, pp. 65-68, 1994.
- [10] M. Ritschka, „Masterarbeit: Optimierung der Herstellung von Protein-Nanokapseln mit Pflanzenölen als Kern und Charakterisierung des Einbaus eines Modellwirkstoffes,“ Universität Wien, 2020.
- [11] R. V. Contri, K. L. Ribeiro, L. A. Fiel, A. R. Pohlmann und S. S. Guterres, „Vegetable oils as core of cationic polymeric nanocapsules: influence on the physicochemical properties,“ *Journal of Experimental Nanoscience*, 8:7-8, pp. 913-924, 2013.
- [12] C. G. Venturini, F. A. Bruinsmann, C. P. Oliveira, R. V. Contri, A. R. Pohlmann und S. S. Guterres, „Vegetable Oil-Loaded Nanocapsules: Innovative Alternative for Incorporating Drugs for Parenteral Administration,“ *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, Vol. 16 No. 2, pp. 1310-1320, 2016.
- [13] G. Herting, I. O. Wallinder und C. Leygraf, „Factors that influence the release of metals from stainless steels exposed to physiological media,“ *Corrosion Science*, 48(8), pp. 2120-2132, 2006.

- [14] Th. Geyer GmbH & Co. KG, „CHEMSOLUTE Technisches Datenblatt: Standard 1 Nährbouillon,“ [Online]. Available: <https://shop.thgeyer-lab.com/owweb/8180.pdf>. [Zugriff am 18.05.2021].
- [15] A. Rollett, T. Reiter, P. Nogueira, M. Cardinale, A. Loureiro, A. Gomes, A. Cavaco-Paulo, A. Moreira, A. M. Carmo und G. M. Guebitz, „Folic acid-functionalized human serum albumin nanocapsules for targeted drug delivery to chronically activated macrophages,“ *International Journal of Pharmaceutics*, 427(2), pp. 460-466, 2012.
- [16] PubChem, „Rifampicin: 3.2.4 Solubility,“ [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135398735#section=Solubility>. [Zugriff am 25.05.2021].
- [17] S. P. Clarke, „Development of Hierarchical Magnetic Nanocomposite Materials for Biomedical Applications,“ Dublin City University, 2013.
- [18] Malvern Instruments Limited, „A basic guide to particle characterization,“ 2015. [Online]. Available: <https://www.cif.iastate.edu/sites/default/files/uploads/Other Inst/Particle%20Size/Particle%20Characterization%20Guide.pdf>. [Zugriff am 17.05.2021].
- [19] Thermo Fisher Scientific, „Micro BCA™ Protein Assay Kit,“ [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23235#/23235>. [Zugriff am 18.05.2021].
- [20] Thermo Fisher Scientific, „Micro BCA™ Reagent A (MA),“ [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23231#/23231>. [Zugriff am 18.05.2021].
- [21] Thermo Fisher Scientific, „Micro BCA™ Reagent B (MB),“ [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23232#/23232>. [Zugriff am 18.05.2021].
- [22] Thermo Fisher Scientific, „Micro BCA™ Reagent C (MC),“ [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23234#/23234>. [Zugriff am 18.05.2021].
- [23] Sigma-Aldrich Inc., „RPMI-1640 Medium,“ [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product Information Sheet/1/r6504pis.pdf>. [Zugriff am 08.05.2021].
- [24] T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella und L. Minor, „Assay Guidance Manual: Cell Viability Assays,“ *National Center for Advancing Translational Sciences*, pp. 1-25, 2013.
- [25] Biomedica Medizinprodukte GmbH, „EZ4U - Nichtradioaktiver Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest,“ [Online]. Available: <https://www.bmgrp.com/wp-content/uploads/2019/03/BI-5000-EZ4U-US-ED-190104-1.pdf>. [Zugriff am 09.05.2021].

- [26] European Committee on Antimicrobial Susceptibility, „Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories,“ 2013. [Online]. Available: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Publications/Disk_diffusion_paper_printed_version_March_2014.pdf. [Zugriff am 17.05.2021].
- [27] V. O. Tarasenko, V. V. Shmatenko, V. O. Kuchmistov, N. O. Koziko, O. P. Shmatenko, A. O. Drozdova, V. V. Rudenko und T. S. Nehoda, „Pharmaceutical development of complex wound-healing ointment for the needs of military medicine,“ *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(4), pp. 662-672, 2017.
- [28] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, „Clinical breakpoints - bacteria (v 11.0) - file for printing,“ 01. 01. 2021. [Online]. Available: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. [Zugriff am 25.05.2021].
- [29] PubChem, „Trimethoprim: 3.2.7 LogP,“ [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5578#section=LogP>. [Zugriff am 18.05.2021].
- [30] PubChem, „Rifampicin: 3.2.6 LogP,“ [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135398735#section=LogP>. [Zugriff am 18.05.2021].
- [31] D. Steinhilber, M. Schubert-Zsilavecz und H. Roth, „13.1 Wirkstoffe gegen bakterielle Infektionen (Antibiotika),“ in *Medizinische Chemie: Targets, Arzneistoffe, Chemische Biologie*, Deutscher Apotheker Verlag, 2010, pp. 519-567.
- [32] D. Steinhilber, M. Schubert-Zsilavecz und H. Roth, „13.2 Antimykobakterielle Wirkstoffe,“ in *Medizinische Chemie: Targets, Arzneistoffe, Chemische Biologie*, Deutscher Apotheker Verlag, 2010, pp. 567-573.
- [33] D. Funk, H.-H. Schrenk und E. Frei, „Serum albumin leads to false-positive results in the XTT and the MTT assay,“ *Biotechniques*, Vol. 43 No. 2, pp. 178-186, 2007.
- [34] D. Maruhn, I. Fuchs, G. Mues und K. D. Bock, „Normal Limits of Urinary Excretion of Eleven Enzymes,“ *Clinical Chemistry*, 22(10), pp. 1567-1574, 1976.
- [35] R. Tapader, S. Basu und A. Pal, „Secreted proteases: A new insight in the pathogenesis of extraintestinal pathogenic Escherichia coli,“ *International Journal of Medical Microbiology*, 309(3-4), pp. 159-168, 2019.
- [36] K. Tam und V. J. Torres, „Staphylococcus aureus Secreted Toxins & Extracellular Enzymes,“ *Microbiology Spectrum* 7(2), 2019.
- [37] G. Dubin, „Extracellular Proteases of Staphylococcus spp.,“ *Biological Chemistry*, 383(7-8), pp. 1075-1086, 2002.